



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**“Evaluación de la capacidad hidrocarbonoclástica de
un consorcio formulado con bacterias aisladas de
canchas de tratamiento de tierra contaminada con
petróleo”**

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo
Parasitólogo**

AUTOR

Paul Gianfranco TERÁN MORALES

ASESOR

Fernando Abilio MERINO RAFAEL

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Terán, P. (2020). *Evaluación de la capacidad hidrocarbonoclástica de un consorcio formulado con bacterias aisladas de canchas de tratamiento de tierra contaminada con petróleo*. Tesis para optar el título de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo. Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código ORCID del autor	0000-0002-3543-1228
DNI del autor	70044899
Código ORCID del asesor (es)	0000-0002-6975-8261
DNI del asesor	08038358
Grupo de investigación	
Financiamiento	
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación (incluirse localidad y/o coordenadas geográficas)	Lima, Perú
Año o rangos de años que la investigación abarcó	2011 - 2014



Universidad Nacional Mayor De San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO PARASITÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 10:00 horas del 09 de julio de 2020, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo** de **PAUL GIANFRANCO TERÁN MORALES**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° **034-EPMP-2019**, el titulando expuso su tesis: **“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD HIDROCARBONOCCLÁSTICA DE UN CONSORCIO FORMULADO CON BACTERIAS AISLADAS DE CANCHAS DE TRATAMIENTO DE TIERRA CONTAMINADA CON PETRÓLEO”** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota **20**, calificativo: **Aprobado con Máximos Honores**.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo** a **PAUL GIANFRANCO TERÁN MORALES** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 11:30 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 09 de julio de 2020.

Dra. SUSANA GUTIERREZ MORENO
(PRESIDENTE)

Mg. FERNANDO MERINO RAFAEL
(ASESOR)

Mg. MARIO ALCARRAZ CURI
(MIEMBRO)

Mg. NORA VERA OBANDO
(MIEMBRO)

*A mi familia, por apoyarme incondicionalmente
y ser mi fuente de inspiración
y fortaleza.*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Julio Terán y Luz Morales, por todo su esfuerzo y sacrificio, en especial en esta etapa tan importante. A mi hermana, Samantha, por su cariño y apoyo. Gracias por impulsarme a ser mejor persona día a día.

A mis profesores, Dra. Susana Gutiérrez Moreno y Mg. Fernando Merino Rafael, por guiarme y enseñarme durante todos los años de formación profesional y apoyarme a culminar esta tesis. A ellos mis mejores deseos y mi gratitud eterna.

A mis compañeros, Pamela, Daniel, Diego, Jonathan, Isaías, Cinthya, Yessenia, Diandra, Elim, Takeshi, Manuel, por hacer del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana un segundo hogar.

A mis revisores y jurados, por sus consejos para mejorar esta tesis.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por permitirme conocer la realidad del Perú; a la Facultad de Ciencias Biológicas, por formarme como profesional y a los que trabajan en la facultad, por darme las facilidades para la ejecución del trabajo de laboratorio.

A todos los que no he podido nombrar y que me apoyaron, directa o indirectamente, muchas gracias por apoyarme a cumplir esta meta.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	MARCO TEÓRICO.....	3
	2.1 Composición del petróleo.....	3
	2.1.1 Hidrocarburos.....	3
	2.1.2 No hidrocarburos	8
	2.2 Explotación petrolera en el Perú	9
	2.3 Técnicas de remediación.....	13
	2.3.1 Tecnologías de remediación fisicoquímicas.....	15
	2.3.2 Tecnologías de remediación biológicas.....	16
	2.4 Vías de degradación.....	19
	2.4.1 Degradación aerobia.....	20
	2.4.2 Efectos de los surfactantes en la degradación de hidrocarburos	25
	2.5 Microorganismos degradadores de hidrocarburos	26
	2.5.1 Genero <i>Pseudomonas</i>	27
	2.5.2 Genero <i>Bacillus</i>	28
	2.6 Análisis de componentes principales (PCA).....	29
III.	OBJETIVOS	31
	3.1 Objetivo general	31
	3.2 Objetivos específicos	31
	3.3 Hipótesis.....	31
IV.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
	4.1 Material biológico	32
	4.2 Evaluación primaria de cepas.....	32
	4.2.1 Purificación y comprobación de actividad hidrocarbonoclástica.....	32

4.2.2 Actividad hidrocarbonoclastica.....	33
4.2.3 Perfil degradativo sobre hidrocarburos.....	34
4.2.4 Actividad emulsificante.....	34
4.3 Selección de las cepas	35
4.3.1 Pre-selección de las cepas.....	35
4.3.2 Prueba de antagonismo entre las cepas pre-seleccionadas.....	36
4.4 Formulación del consorcio.....	37
4.4.1 Identificación molecular de las cepas.....	37
4.5 Evaluación del consorcio.....	38
4.5.1 Cinética de crecimiento del consorcio.....	38
4.5.2 Degradación de hidrocarburos en medio líquido.....	39
V. RESULTADOS.....	40
5.1 Evaluación primaria de cepas.....	40
5.1.1 Purificación y comprobación de actividad hidrocarbonoclástica.....	40
5.1.2 Actividad hidrocarbonoclastica.....	41
5.1.3 Perfil degradativo sobre hidrocarburos.....	44
5.1.4 Actividad emulsificante.....	49
5.2 Selección de las cepas	51
5.2.1 Pre-selección de las cepas.....	51
5.2.2 Prueba de antagonismo entre las cepas pre-seleccionadas.....	55
5.3 Formulación del consorcio.....	56
5.3.1 Formulación del consorcio	56
5.3.2 Identificación molecular de las cepas.....	57
5.4 Evaluación del consorcio.....	60
5.4.1 Cinética de crecimiento del consorcio.....	60
5.4.2 Degradación de hidrocarburos en medio líquido.....	62

VI. DISCUSIONES	67
6.1 Evaluación de la capacidad degradativa y emulsificante de las cepas bacterianas sobre hidrocarburos de petróleo	67
6.2 Selección de las cepas y evaluación de la actividad antagonista	71
6.3 Formulación del consorcio a utilizar e identificación de las cepas	72
6.4 Evaluación del consorcio bacteriano sobre la degradación de hidrocarburos en medio líquido	73
VII. CONCLUSIONES	76
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
IX. ANEXO	88
9.1 Resultados	88
9.2 Análisis estadístico	93

RESUMEN

A pesar de que en el Perú se realiza una intensiva actividad en el sector hidrocarburo, actualmente no existe un inventario de suelos contaminados por petróleo, por lo cual no se conoce la verdadera magnitud de la contaminación; aun cuando las demandas sociales para la aplicación de medidas de mitigación del impacto ambiental son cada vez mayores. La biorremediación se perfila como una alternativa viable a las técnicas físico-químicas de mayor costo e impacto ambiental para el manejo de suelos contaminados; sin embargo, es necesaria su adecuación para cada situación particular, por lo cual en este trabajo se realiza la evaluación de la capacidad degradativa y emulsificante de cepas bacterianas y la formulación de un consorcio para el tratamiento de tierra contaminada con petróleo en una zona específica. Se seleccionaron 30 cepas bacterianas aisladas de canchas de tratamiento de tierra contaminada con petróleo, de las cuales se obtuvieron 44 cepas para su evaluación. Nueve cepas presentaron actividad degradativa y 3 cepas mostraron alta actividad emulsificante, con perfiles degradativo variados en el crecimiento de borra, kerosene, diésel y parafina; se pre-seleccionaron 7 cepas con las mejores características para la ejecución de las pruebas de antagonismo. El consorcio bacteriano se formuló con 3 cepas: *Pseudomonas aeruginosa* C1BHIC5, *Pseudomonas aeruginosa* C3ACETC53a y *Bacillus subtilis* C3ACETC53b, finalmente se determinó que el porcentaje de reducción atribuible al consorcio microbiano formulado es del 25,25%. Estos resultados muestran que cepas aisladas con capacidad hidrocarbonoclástica pueden servir para la formulación de un consorcio aplicable a una situación particular.

Palabras claves: biorremediación, consorcio bacteriano, petróleo, hidrocarbonoclástica, emulsificante, *Pseudomonas aeruginosa* C1BHIC5, *Pseudomonas aeruginosa* C3ACETC53a and *Bacillus subtilis* C3ACETC53b

Abstract

Although in Peru there is intensive activity in the hydrocarbon sector, there is currently no inventory of oil-contaminated soils, so the true extent of the contamination is unknown; even though the social demands for the application of environmental impact mitigation measures are increasing. Bioremediation is emerging as a viable alternative to the physicochemical techniques of greater cost and environmental impact for the management of contaminated soils; however, its adaptation is necessary for each particular situation, so in this work the evaluation of the degradative and emulsifying capacity of bacterial strains and the formulation of a consortium for the treatment of land contaminated with oil in a specific area is carried out. 30 bacterial strains isolated from oil-contaminated soil treatment fields were selected, of which 44 strains were obtained for evaluation. Nine strains exhibited degradative activity and 3 strains showed high emulsifying activity, with varying degradation profiles in the growth of borra, kerosene, diesel and paraffin. Of these 44 strains, 7 strains with the best characteristics for the execution of the antagonism tests were pre-selected. The bacterial consortium was formulated with 3 strains: *Pseudomonas aeruginosa* C1BHIC5, *Pseudomonas aeruginosa* C3ACETC53a and *Bacillus subtilis* C3ACETC53b, finally, it was determined that the percentage of reduction attributable to the formulated microbial consortium is 25.25%. These results show that isolated strains with hydrocarbonoclastic capacity can be used to formulate a consortium applicable to a particular situation.

Keywords: bioremediation, bacterial consortium, petroleum, hydrocarbonoclast, emulsifier, *Pseudomonas aeruginosa* C1BHIC5, *Pseudomonas aeruginosa* C3ACETC53a and *Bacillus subtilis* C3ACETC53b.

I. INTRODUCCIÓN

La industria del petróleo es de suma importancia por las necesidades que satisface debido a la amplia gama de productos que origina, es así que su infraestructura como sus actividades, desde la fase de explotación hasta la obtención de productos petroquímicos básicos, poseen riesgos inherentes de fugas que pueden contaminar el suelo, el agua y la atmósfera (Brito *et al.*, 2003).

Las consecuencias de los derrames de petróleo en el suelo han sido descritas extensivamente, luego de la contaminación se inician una serie de procesos físico-químicos simultáneos que ocasionan una mayor toxicidad (Ibarra, 2008), así mismo este proceso modifica las características físicas y químicas del suelo reduciendo drásticamente la calidad del mismo (Martínez y López, 2001) afectando la germinación y crecimiento vegetativo de diferentes especies de plantas (Alkorta y Garbisu, 2001; López *et al.*, 2006; Vázquez-Luna *et al.*, 2010). La toxicidad del petróleo dificulta el tratamiento, ya que en altas concentraciones es letal para muchos microorganismos utilizados en el tratamiento de suelos, además la contaminación por petróleo origina una variación en la estructura funcional de la comunidad bacteriana, así como una disminución de la diversidad lo que origina una alteración permanente de la estructura comunitaria (Zamora *et al.*, 2012).

Esta situación, que origina el deterioro progresivo de la calidad del ambiente y genera una amenaza real a la salud pública, se complica por el enorme grado de dificultad y costo de la remediación; y si bien en estos suelos ocurre una degradación natural originada principalmente por la microbiota nativa, ésta presenta una baja velocidad y depende de condiciones ambientales favorables como la temperatura, oxígeno, humedad, pH y nutrientes. Esta dependencia a los factores ambientales permite el desarrollo de técnicas de biorremediación

que permiten bajo ciertas condiciones incrementar la remoción de Hidrocarburos Totales del Petróleo (TPH), siendo una de las principales variables los microorganismos utilizados para la biorremediación, sin embargo el amplio espectro de porcentajes de remoción reportados (Mishra *et al.*, 2001; Ouyang *et al.*, 2005) indican que la evaluación de las cepas antes de su inoculación es fundamental para el éxito de la biorremediación (Bento *et al.*, 2005).

En este sentido se propone la evaluación de un consorcio formulado de bacterias aisladas de canchas de tratamiento de tierra contaminada con petróleo que pueda ser utilizado en una estrategia de remediación de suelos que permita una remoción de TPH superior a las técnicas física-químicas como el lavado de suelo, encapsulación, vitrificación, etc., con una disminución en el tiempo así como, de la relación costo-beneficio permitiendo su aplicación a gran escala.

II. MARCO TEÓRICO

El uso moderno del petróleo se remonta a los 1800s, pero no fue hasta la última mitad del siglo 20 que los avances en la química del petróleo permitió modificación substanciales y la diversificación de las aplicaciones comerciales (Agnello, 2002); por tal motivo el “crudo de petróleo” ha sido estudiado profundamente, a continuación se presenta un resumen de la composición más aceptada del petróleo según Speight, 1994, 1998, 2005 y 2014.

2.1 Composición del petróleo.

Es conocido que el nombre de “crudo de petróleo” no describe una sustancia en particular, sino más bien a una mezcla de varios compuestos orgánicos e inorgánicos, cuya composición varia de un campo de producción a otro e incluso dentro del mismo (Speight, 1994; Speight, 1998). Siendo los hidrocarburos, los compuestos que se presentan en mayor cantidad, desde estructuras lineales muy simples hasta sustancias de alto peso molecular; se puede afirmar que existen 4 fracciones principales: parafínicos, naftenos, aromáticos y asfálticos (Speight, 2014). Además, el crudo contiene una cantidad apreciable de compuestos orgánicos no hidrocarburos derivados del nitrógeno, oxígeno, sulfuro, y en menores concentraciones sales inorgánicas y metales como níquel y vanadio (Speight, 2005). A continuación se presenta un resumen de los principales componentes del crudo de petróleo.

2.1.1 Hidrocarburos

Los hidrocarburos constituyen los elementos esenciales del petróleo; sus moléculas no contienen más que hidrogeno y carbono y se dividen en varias familias químicas según su estructura. Estos componentes son analizados, generalmente, mediante cromatografía de gases en combinación con

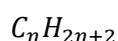
espectrofotometría de masas, por lo cual las estructuras que no pueden ser identificadas por este método son desconocidas; en consecuencia varios métodos de análisis como detección por ionización por flama, espectrofotometría por absorción UV- o IR-, NMP en combinación con técnicas de separación apropiadas y/o conversiones químicas son necesarias para caracterizar el petróleo (Harayama *et al.*, 1999).

Las cadenas moleculares carbono – carbono pueden estar unidos por enlaces simples o enlaces múltiples (doble o triple); estos últimos enlaces dan lugar a insaturaciones, pudiendo ser conjugados si 2 enlaces múltiples estén separados por un enlace simple. Todas estas estructuras están basadas en la tetravalencia del carbono.

Cuatro tipos de moléculas de hidrocarburos componen el crudo de petróleo, el porcentaje relativo de cada tipo de molécula varia de un crudo a otro, controlando las propiedades químicas y físicas del petróleo. A continuación se presentan los grupos con mayor representatividad en el petróleo.

Parafínicos o saturados alifáticos

Estos hidrocarburos consisten en una cadena de átomos de carbono conteniendo de 0 a 3 átomos de hidrógeno, exceptuando el metano (CH₄), unidos por medio de enlaces simples; siendo la fórmula general de estas moléculas la siguiente:



Estos hidrocarburos pueden ser estructurados como cadenas lineales (parafínicos o alcanos) o ser ramificados por medio de la sustitución de un

hidrogeno con un carbono o cadenas hidrocarbonadas (isoparafínicos o isoalcanos). Ejemplos de estos tenemos:

Tabla 1. Ejemplos de hidrocarburos parafínicos

Hidrocarburo	Formula	Formula estructural*	Peso molecular
Metano	CH ₄	C	16
Etano	C ₂ H ₆	C – C	30,1
Propano	C ₃ H ₈	C – C – C	44,1
n-Butano	C ₄ H ₁₀	C – C – C – C	58,1
Isobutano	C ₄ H ₁₀	$\begin{array}{c} \text{C} \\ \\ \text{C} - \text{C} - \text{C} \end{array}$	58,1
n-Pentano	C ₅ H ₁₂	C – C – C – C – C	72,1
m-Heptano	C ₇ H ₁₆	C – C – C – C – C – C – C	100,2

*Átomos de hidrogeno han sido omitidos
Fuente: Speight, 2014

El punto de ebullición incrementa con aumento de la cantidad de números de carbono. En las moléculas con menor número de carbonos, la suma de un átomo de carbono acrecienta en unos 25°C su punto de ebullición, este aumento es menos significativo conforme aumenta el peso molecular del hidrocarburo. El peso molecular también afecta a la densidad, originando el incremento de esta última conforme el peso molecular aumenta: 0,626 Kg/l para el pentano, 0,791 Kg/l para el pentacosano, siendo siempre inferior a uno. Las parafinas que presentan ramificaciones poseen un punto de ebullición menor al de las parafinas con igual cantidad de números de átomos de carbono.


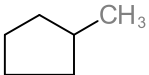

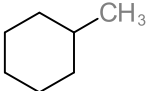
Naftenos o cíclicos saturados

Estos hidrocarburos también llamados cicloalcanos o naftenos, contienen estructuras cíclicas en toda o alguna parte de la molécula, presentando un numero variable de átomos de carbono dentro del anillo unidos por medio de enlaces simples, siendo su fórmula general la siguiente:



Los anillos que se encuentran en mayor cantidad en el petróleo crudo son aquellos con 5 o 6 átomos de carbono; pudiendo sustituirse cada átomo de hidrogeno por un alquilo de cadena simple o ramificada. Ejemplo de este tipo de hidrocarburos son los siguientes:

Tabla 2. Ejemplos de hidrocarburos naftenos

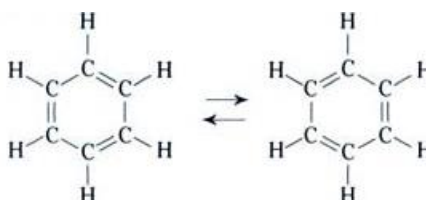
Hidrocarburo	Formula	Formula estructural	Peso molecular
Ciclopentano	C ₅ H ₁₀		70,1
Metilciclopentano	C ₆ H ₁₂		84,2
Ciclohexano	C ₆ H ₁₂		84,2
Metilciclohexano	C ₇ H ₁₄		98,2

Fuente: Speight, 2014

Cabe mencionar que estas moléculas tienen su temperatura de ebullición y densidad superiores a los alcanos con la misma cantidad de átomos de carbono.

Aromáticos

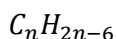
Estos hidrocarburos poliinsaturados cíclicos conjugados están presentes en altas concentraciones en el crudo de petróleo. La estructura básica para todos los aromáticos es el anillo bencénico como lo ilustra la fórmula de Kekule:



La fórmula estructural se representa generalmente:



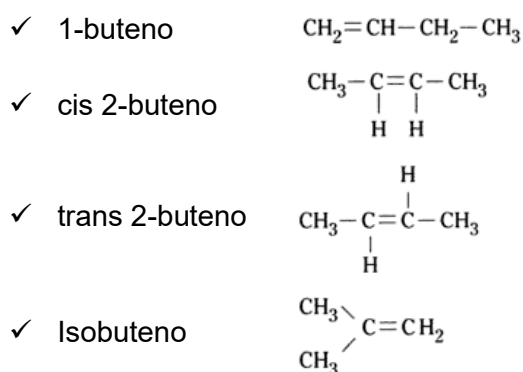
La fórmula general de este tipo de moléculas es la siguiente:



Cabe mencionar que los átomos de hidrogeno puede ser sustituidos por grupos alquilo originando alquilo-aromáticos (orto, meta y para dependiendo de las posiciones de los sustituyentes), por otros aromáticos donde un segundo anillo puede sustituir a 2 hidrógenos adyacentes generando aromáticos condensados polinucleares o por sustituidos por anillos nafténicos formando nafteno aromáticos.

Asfálticos o alifáticos insaturados

En este grupo, algunos átomos de carbono están unidos a solo 3 átomos, lo que implica la existencia de uno o más dobles enlaces entre átomos de carbono. Teniendo en cuenta los dobles enlaces, estas moléculas son muchas más complejas que las familias anteriores, por ejemplo los isómeros del C_4H_8 pueden tener numerosos arreglos:



Cabe mencionar que estas moléculas contienen desde 40 a más de 60 átomos de carbono, confiriéndole características de sólido o semisólido y un alto punto de ebullición.

2.1.2 No hidrocarburos

Se definen como moléculas que contienen átomos diferentes carbono e hidrógeno, siendo los principales los compuestos orgánicos heteroatómicos y los órgano-metálicos.

Compuestos heteroatómicos de azufre

Es el compuesto heteroatómico con mayor presencia en el petróleo crudo. Puede estar presente en una concentración entre el 0,1% a >8 % del peso; su concentración se relaciona con la densidad del crudo y, por ende, con su calidad. El azufre puede formar parte de moléculas inorgánicas: azufre elemental, ácido sulfhídrico, sulfuro de carboxilo; o de moléculas orgánicas:

- ✓ Sulfuros, intercalándose en una cadena saturada.
- ✓ Disulfuros, presentes sobre todo en las fracciones ligeras.
- ✓ Tioles o mercaptanos, donde el hidrogeno ligado al azufre tiene carácter ácido.
- ✓ Tiofenos y sus derivados, donde el azufre se inserta en ciclos aromáticos.

Compuestos heteroatómicos oxigenados

Por lo general, en el petróleo se encuentran menor cantidad de los compuestos oxigenados que los que contiene azufre; sin embargo puede poseer un papel importante en la acidez de los crudos. El oxígeno se encuentra en:

- ✓ Fenoles, el hidrogeno de un anillo aromático se sustituye por un hidroxilo.
- ✓ Furanos y benzofuranos, un anillo oxigenado esta encuentra condensado con uno o varios anillos aromáticos.

- ✓ Ácidos carboxílicos y ésteres, en los cuales estos grupos pueden estar unidos a un radical alquilo, anillo aromático o un anillo saturado.

Compuestos heteroatómicos nitrogenados

Estos compuestos se presentan principalmente en las fracciones de las resinas y asfaltenos, bajo las siguientes formas:

- ✓ Amidas, saturadas como aromáticas
- ✓ Aminas
- ✓ Carbazoles, un anillo nitrogenado se encuentra condensado a uno o varios aromáticos
- ✓ Piridinas, el nitrógeno se encuentra en un anillo hexagonal con 3 dobles enlaces.

Compuestos organometálicos

En las fracciones pesadas del petróleo, como las resinas y asfaltenos, se concentran los átomos metálicos como el níquel y vanadio, formando parte de las familias de las porfirinas (constituidas por cuatro anillos pirrólicos, con el metal en el centro (Ni^{2+} ó Vo^{+}))

2.2 Explotación petrolera en el Perú

La explotación de petróleo se inició en la costa norte peruana (año 1863), posteriormente se extendió hacia la sierra (año 1906), selva (año 1939) y finalmente en el zócalo continental (año 1955). Durante los años 80s, el Perú, se convirtió en autosuficiente en materia petrolera, financiando entre el 20% y 30% del presupuesto con los impuestos generados por la industria petrolera. En el 2007, Perú ocupó el séptimo lugar en reservas y producción de América Latina, siendo actualmente un productor pequeño de petróleo (Ortiz *et al.*, 2009).

Para el 2009, existían aproximada de 14 013 pozos perforados, 5 069 activos y 8 944 abandonados; la distribución de los pozos, según su ubicación, es la siguiente (Ortiz *et al.*, 2009):

- ✓ 11 989 pozos perforados en la costa norte, 3 927 activos y 8 062 abandonados.
- ✓ 1380 pozos perforados en el zócalo continental, 839 activos y 541 abandonados.
- ✓ 32 pozos perforados en la sierra, todos abandonados
- ✓ 612 pozos perforados en la selva, 303 activos y 309 abandonados.

Derrames de hidrocarburo

A lo largo del Perú se han producido una serie de derrames de hidrocarburos causados por fallas mecánicas o humanas, que han repercutido en la calidad ambiental del suelo, agua y aire, a continuación se listan los principales derrames ocurridos a partir de 1995 hasta el 2010, según la lista recopilada por la Sociedad Peruana de Derecho Ambiental (SPDA), 2010:

- ✓ Playa Conchán – Agosto 1995. Se derramó petróleo del barco “Ariete” en el muelle de Petro-Perú.
- ✓ Salaverry – Marzo 2000. Durante la transferencia de petróleo industrial en la Planta de Abastecimiento “Terminal Salaverry”, se derramaron 101 barriles de petróleo producto de un rebose.
- ✓ Río Marañón – Octubre 2000. Se derramaron 5500 barriles de petróleo de las instalaciones de Pluspetrol.
- ✓ Eten – Enero 2001. Se produjeron dos derrames en el Puerto Eten que afectó siete playas de Chiclayo
- ✓ Talara – Octubre 2001. Se derramaron 20 barriles de residuos oleosos de Petro-Perú en la zona de Punta Arenas.

- ✓ Talara – Agosto 2002. Se derramaron 500 barriles de petróleo en el área de Pariñas.
- ✓ Cajamarca – Enero 2004. Se derramaron 6000 galones de lubricante en el río Jequetepeque.
- ✓ Ilo – Setiembre 2004. Se derramó petróleo, de la compañía Graña y Montero, en el malecón del puerto de Ilo.
- ✓ Río Marañón – Octubre 2004. Se derramó petróleo en el río Marañón
- ✓ Playa Conchán – Enero 2005. Se derramaron 10 barriles de petróleo en las playas de Conchán, implicando a la Refinería Conchán y el buque “BAP Talara”.
- ✓ Callao – Junio 2006. Se derramaron 1500 galones de diesel del buque tanque “Sebastián” en el Muelle de Pescadores del Callao.
- ✓ Talara – Febrero 2007. Se originó una grieta en la línea submarina de boyas del terminal Talara de Petro-Perú al finalizar la carga de petróleo en el buque tanque “Cabo Hellas”.
- ✓ Bagua – Mayo 2007. Se originó un alud en la provincia de Bagua en Amazonas, afectando al Oleoducto Nor-Peruano, derramando 100 barriles de crudo.
- ✓ Callao – Agosto 2007. Se derramaron 120 toneladas de petróleo en el muelle Minerales de la Empresa Nacional de Puertos del Perú (ENAPU).
- ✓ Selva peruana. La Federación de Comunidades Nativas del río Corrientes (FECONACO) sindicó como responsable a la empresa Pluspetrol Norte por 6 derrames de petróleo durante el 2007.
- ✓ Torata – Enero 2008. Se derramaron más de 9350 galones de petróleo en los ríos Chilligua y Huaracane producto de una volcadura de una cisterna de petróleo en Torata.
- ✓ Tumbes – Enero 2008. Producto de la explosión del “BAP Supe”, que trasladaba crudo entre el Lote Z-1 (Tumbes) y la refinería de PetroPerú

(Piura), se derramaron 1300 barriles de crudo, que resultaron consumidos en el incendio que persistió más de cuatro horas.

- ✓ La Libertad – Octubre 2008. Tres hectáreas de sembríos en el caserío de Plazapampa (Otuzco, La Libertad) resultaron contaminadas por un camión cisterna lleno de combustible que suministra de petróleo al Proyecto Minero Lagunas Norte de la empresa minera Barrick Misquichilca.
- ✓ Río Corrientes. FECONACO sindicó como responsable a la empresa Pluspetrol por 18 derrames de petróleo durante el 2008.
- ✓ Talara – Enero 2008. Derrame de petróleo en la plataforma Z-2B de Petrotech.
- ✓ Talara – Febrero 2008. Derrame de combustible tipo bunker durante el abastecimiento del “BAP Bayóvar” en el muelle de Talara.
- ✓ Pucallpa – Marzo 2008. El oleoducto Nor-Peruano sufrió deterioros, originando un derrame de petróleo crudo en un área situada a seis kilómetros de Pucallpa.
- ✓ Río Itaya – Setiembre 2008. Se derramaron más de 3000 galones de petróleo y gasolina al río Itaya (Loreto) producto de la volcadura de un grifo flotante de venta de combustible.
- ✓ Río Corrientes. FECONACO responsabilizó a la compañía Pluspetrol Norte por 16 derrames de petróleo en la cuenca del Corrientes durante el 2009.
- ✓ Talara – Febrero 2010. Se originó un derrame de petróleo en la plataforma LS de la empresa petrolera Savia del Perú (ex Petrotech Peruana).
- ✓ Pisco – Marzo 2010. Se derramaron 100 galones de petróleo debido a la ruptura de una tubería submarina de la Compañía Consorcio Terminales Pisco Camisea (GMP) por el buque tanque “Timachesvk”.
- ✓ Talara – Abril 2010. Personal de puerto de La Tortuga dejó caer una manga de combustible en el momento que suministraba al cargador “Kodiak Island”.

- ✓ Río Pabellón – Mayo 2010. Se derramaron 3000 galones de petróleo producto de un accidente de tránsito con un camión cisterna de combustible.
- ✓ Río Marañón – Marzo 2010. Se derramaron entre 300 y 400 barriles de petróleo originado por el encallamiento de la barcaza “Sanam III” de Pluspetrol Norte cerca a Saramuro.

2.3 Técnicas de remediación

Las técnicas de remediación implican cualquier proceso unitario o sucesión de ellos que alteren la composición de un contaminante por medio de reacciones químicas, físicas o biológicas con el fin de reducir la toxicidad, movilidad o cantidad del material peligroso (Environmental Protection Agency (EPA), 2001), las cuales se presentan como una opción a la disposición final de los contaminantes que no han sido tratados, sin embargo sus posibilidades de éxito pueden variar ampliamente de acuerdo a las diferentes condiciones (Atlas, 1981).

Cabe mencionar que existe una atenuación natural ligada, fundamentalmente, a procesos biológicos originados por los microorganismos; pero también por procesos físicos y químicos debido a las condiciones ambientales, como: lavado, volatilización, fotodescomposición, hidrólisis, inmovilización por adsorción y formación de enlaces con arcillas, oxi-hidróxidos, entre otros (Pardo *et al.*, 2004).

Las tecnologías se pueden clasificar en base a su principio fundamental: (I) estrategia de remediación; (II) lugar donde se realiza y (III) tipo de tratamiento (Velasco y Volke, 2003); a continuación se describen con detalle las clasificaciones anteriores:

- (I) Estrategias de remediación: son tres estrategias primordiales que pueden utilizarse separadas o en conjunto.
- ✓ Destrucción o alteración. Busca trastornar la estructura química del contaminante
 - ✓ Extracción o separación. Los contaminantes se extraen y/o apartan del medio contaminante, por medio de sus propiedades físicas o químicas.
 - ✓ Aislamiento o inmovilización. Los contaminantes son estabilizados, solidificados o contenidos por medios físicos y/o químicos.
- (II) De acuerdo al lugar donde se realiza: son dos tipos de tecnologías excluyentes entre sí.
- ✓ *In situ*. Los contaminantes son removidos, sin obligación de excavar el lugar. Esta técnica se realiza en el mismo sitio en donde se halla la contaminación.
 - ✓ *Ex situ*. La ejecución de esta técnica, es obligatoria la excavación, dragado o cualquier otra acción para remover la matriz contaminada antes de su tratamiento; el cual puede realizarse en el mismo sitio (*on site*) o fuera de el (*off site*)
- (III) Tipo de tratamiento: se fundamenta en el principio de la tecnología de tratamiento, existiendo dos métodos.
- ✓ Tratamiento biológico. Utiliza las rutas metabólicas de ciertos organismos para degradar o transformar los contaminantes a compuestos inocuos.
 - ✓ Tratamientos fisicoquímicos. Emplea las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o de la matriz contaminada para destruir, remover o contener la contaminación.

Adicionalmente según la Environmental Protection Agency (EPA), 2007, las tecnologías de remediación se pueden clasificar en tecnologías tradicionales e innovadoras:

- ✓ Tecnologías tradicionales. Son métodos empleados usualmente a gran escala, cuya efectividad está comprobada. La información referente a costos y operación es de sencillo acceso; las más conocidas son: incineración *in situ* y *ex situ*, solidificación, estabilización, extracción de vapores y la desorción térmica.
- ✓ Tecnologías innovadoras. Son tecnologías planteadas más recientemente, que se hallan en diferentes etapas de desarrollo (investigación, escala piloto o gran escala). Estas tecnologías tienen el potencial de proveer un mejor costo-efectividad que los métodos tradicionales y una solución a los problemas ambientales considerados imposibles de solucionar.

2.3.1 Tecnologías de remediación fisicoquímicas

Las técnicas fisicoquímicas aprovechan las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o de la matriz contaminada para destruir, separar o contener la contaminación. Estas tecnologías pueden obtener resultados en periodos cortos de tiempo, sin embargo los costos pueden aumentar cuando se emplean métodos de separación en las que los contaminantes necesitan un tratamiento posterior o disposición final. Mientras que las tecnologías de biorremediación son principalmente destructivas, las fisicoquímicas permiten la separación, inmovilización y destrucción del contaminante; al igual que las demás tecnologías pueden realizarse *in situ* o *ex situ*, sin embargo estas tecnologías se aplican principalmente *in situ* (Bernad *et al.*, 2007). Entre estas tecnologías se encuentran:

- ✓ Extracción
- ✓ Lavado
- ✓ Electrocínética
- ✓ Oxidación ultravioleta
- ✓ Estabilización físico-química

✓ Vitrificación

2.3.2 Tecnologías de remediación biológicas

Comprenden diferentes metodologías que dependen de los organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, etc.) para remover, degradar o transformar compuestos orgánicos e inorgánicos tóxicos a productos metabólicos inócuos o de menor toxicidad. Este tipo de técnicas dependen del metabolismo de los organismos para utilizar los contaminantes orgánicos como fuente de energía y/o alimento (Marks *et al.*, 1994); en el caso de los contaminantes inorgánicos, este proceso pueden incluir reacciones óxido-reducción, sorción y desorción, así como reacciones de acomplejamiento y quelación (Eweis *et al.*, 1998).

Los contaminantes orgánicos son transformados habitualmente por los microorganismos ya que logran emplearlos en su desarrollo como fuente de carbono y energía; cabe mencionar que para asegurar su crecimiento es obligatorio la existencia de donantes y aceptores de electrones, fuente de carbono y nutrientes (N, P, K, S, Mg, Ca, Mn, Fe, Zn, Cu y elementos traza) (Bernad *et al.*, 2007). Existen tres procesos por los que los microorganismos logran biodegradar compuestos orgánicos: fermentación, respiración aerobia y respiración anaerobia. En el transcurso de la fermentación, los compuestos orgánicos son degradados por medio de una sucesión de reacciones enzimáticas que no implican una cadena de transporte de electrones y pueden actuar como donantes o como aceptores de electrones. En el transcurso de la respiración aerobia, los microorganismos emplean el oxígeno como aceptor de electrones para la respiración microbiana, cuando la respiración tiene lugar en condiciones anaerobias, el oxígeno es sustituido por compuestos o elementos orgánicos o inorgánicos oxidados que logran ser empleados como aceptores de electrones alternativos, como el nitrato, iones metálicos (Fe(III), Mn(IV)), sulfato o

dióxido de carbono. Por su lado, los compuestos orgánicos logran ser metabolizados a metano, dióxido de carbono e hidrógeno. La biodegradación aerobia tiene las ventajas de que los organismos aerobios crecen más rápido que los anaerobios y logran conservar tasas de degradación más altas pero requieren una constante provisión de oxígeno que en frecuentemente puede limitar el proceso de biodegradación (Bernad *et al.*, 2007).

A pesar no todos los compuestos orgánicos logran ser susceptibles a la biodegradación, los métodos de biorremediación se han empleado con éxito para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados con hidrocarburos del petróleo (HTP), solventes (benceno y tolueno), explosivos (TNT), clorofenoles (PCP), pesticidas (2,4-D), conservadores de madera (creosota) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Semple *et al.*, 2001).

A continuación se presentan las técnicas de biorremediación de suelos contaminados que se han desarrollado a lo largo del tiempo de acuerdo a las diferentes necesidades y dimensiones del problema según lo descrito por Velasco y Volke, 2003:

Bioestimulación

Consiste en la adición de soluciones acuosas que contengan nutrientes (nitrógeno, fosforo y potasio) en el suelo contaminado, con la finalidad de estimular la actividad degradadora de los microorganismos. Este tipo de tecnología no se recomienda para suelos arcillosos, altamente estratificados o demasiados heterogéneos, ya que pueden provocar limitación en la transferencia de nutrientes y oxígeno además puede provocar un aumento en el movimiento de los contaminantes.

Bioaireación

Es una forma de bioestimulación, donde se adiciona oxígeno al suelo para acelerar la degradación de cualquier compuesto biodegradable en condiciones aerobias. El aire se provee al suelo por movimiento forzado y a baja velocidad de flujo, con el propósito de suministrar únicamente el oxígeno requerido para mantener la actividad de los microorganismos degradadores. Un factor que puede afectar este tipo de tecnología es la dificultad para asegurar la distribución homogénea del aire en el suelo ya que depende de la permeabilidad del mismo.

Bioaumentación

Es la inoculación de una alta concentración de microorganismos, que tengan la capacidad de degradar el contaminante en cuestión, se utiliza cuando se requiere de un tratamiento inmediato o si la microflora autóctona es escasa en número o capacidad degradadora. El tamaño del inóculo varía del tamaño del área contaminada, dispersión de los contaminantes y de la velocidad de crecimiento de los microorganismos. La principal limitación es la necesidad de realizarse el aislamiento y el cultivo de los microorganismos a utilizar.

Compostaje

Para esta tecnología se conforman biopilas con el material contaminado, las que se tiene que mezclar y humedecer periódicamente para favorecer la actividad de los microorganismos aeróbicos, principalmente termofílicos, que aceleren la degradación del contaminante.

Fitoremediación

Esta técnica utiliza plantas para remover, contener o transformar el contaminante, la acción sobre dicho compuesto puede ser directa, la planta

actúa sobre el contaminante, o indirecta, la planta estimular microorganismos en la rizósfera o estabiliza el contaminante en el suelo.

Landfarming

Es probablemente la técnica más utilizada para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos y de otros desechos de la industria petrolera. Se realiza el traslado del material contaminado a un sitio previamente impermeabilizado donde se realizará bioestimulación, oxigenación o bioaumentación según sea necesario.

Biorreactores

Los biorreactores pueden usarse para suelos heterogéneos y poco permeables, o cuando es necesario reducir el tiempo de tratamiento, ya que se puede controlar eficientemente los procesos químicos, físicos y biológicos a fin de optimizar la biodegradación. Es la tecnología más conveniente cuando hay riesgos potenciales de descargas y emisiones al ambiente. Uno de los más utilizados es el reactor de lodos, donde el suelo se mezcla con una fase líquida y la degradación se realiza en fase acuosa por microorganismos en suspensión o inmovilizados en alguna fase sólida.

2.4 Vías de degradación

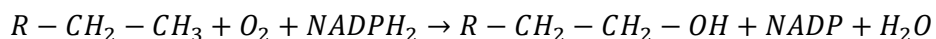
A continuación se presenta un resumen de las vías más estudiadas y conocidas de degradación de hidrocarburos según lo descrito por Bartha y Atlas, (2002), cabe mencionar que solo se tratara la vía aeróbica ya que es la utilizada en el presente estudio.

2.4.1 Degradación aerobia

Parafínicos o saturados alifáticos

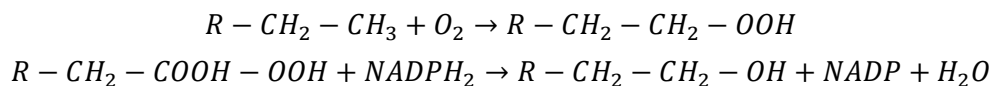
El ataque inicial de los alcanos lo realizan enzimas que tienen una necesidad estricta de oxígeno molecular, esto es, son monooxigenasas o dioxigenasas. En el primer caso (Ecuación 1) un átomo de O_2 se incorpora en el alcano, produciendo un alcohol primario. El otro se reduce a H_2O , y la forma reducida del fosfato de nicotinamida-adenín-dinucleótido ($NADPH_2$) actúa como donador de electrones.

Ecuación 1.



En el segundo caso, dos átomos de oxígeno se integran en un alcano lo que produce un intermediario hidroperóxido inestable; el cual se reduce, mediante el $NADPH_2$, a un alcohol y H_2O (Ecuación 2)

Ecuación 2.



Frecuentemente, el ataque se origina sobre un grupo metilo terminal, formando un alcohol primario que, posteriormente, se oxida a un aldehído y un ácido graso. Ocasionalmente, ambos grupos metilo terminales pueden ser oxidados de esta forma, causando la formación de un ácido dicarboxílico. Esta variación, denominada oxidación diterminal o ω -oxidación, es una de las varias formas de evitar un bloqueo a la β -oxidación debido a una ramificación en la cadena de carbono.

Una vez que se forma un ácido graso, continúa el catabolismo mediante la β -oxidación. El ácido graso de cadena larga se transforma en su forma acil

$$\text{H}-\text{CH}-\text{COC}$$

Ya que la secuencia de β -oxidación no requiere la presencia de oxígeno molecular, después de la oxidación inicial, la oxidación de los ácidos grasos puede suceder en condiciones anóxicas.

Algunos microorganismos son capaces de atacar alcanos de manera subterminal, es decir, el oxígeno se inserta sobre un átomo de carbono del interior de la cadena en lugar de uno del extremo, originándose un alcohol secundario, que luego se oxida a una cetona y finalmente a un éster. El enlace éster se rompe, produciendo un alcohol primario y un ácido graso; al alcohol se oxida al ácido análogo a través del aldehído y el metabolismo de ambos fragmentos continúa por la secuencia de la β -oxidación (Figura 1).

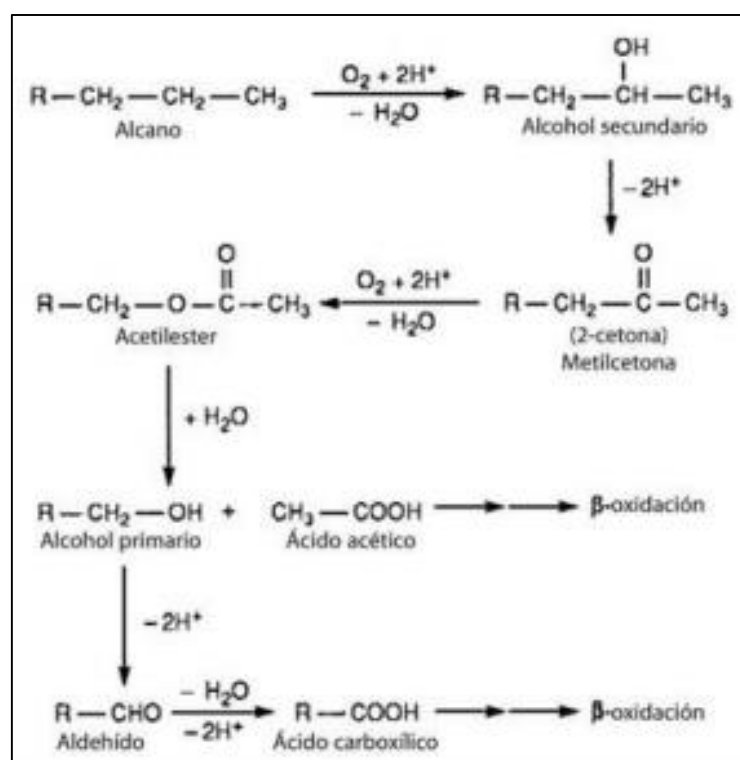


Figura 1. Oxidación subterminal de alcanos

Naftenos o cíclicos saturados

Los hidrocarburos alicíclicos que no tienen grupos metilo terminales, se degradan por un mecanismo similar al de la oxidación subterminal mostrado en

la Figura 3. En el caso del ciclohexano (Figura 2), la hidroxilación por una monooxigenasa produce un alcohol alicíclico, la deshidrogenación origina una cetona. El proceso de la oxidación continúa con la inserción de un oxígeno en el anillo formando una lactona, el grupo hidroxilo se oxida secuencialmente a un aldehído y un grupo carboxilo, finalmente el ácido dicarboxílico resultante es metabolizado por la β -oxidación. Es muy frecuente que los organismos que convierten el ciclohexano en ciclohexanona no puedan lactonizar y abrir el anillo y viceversa, por lo que el cometabolismo y comensalismo desempeñan un papel muy importante.

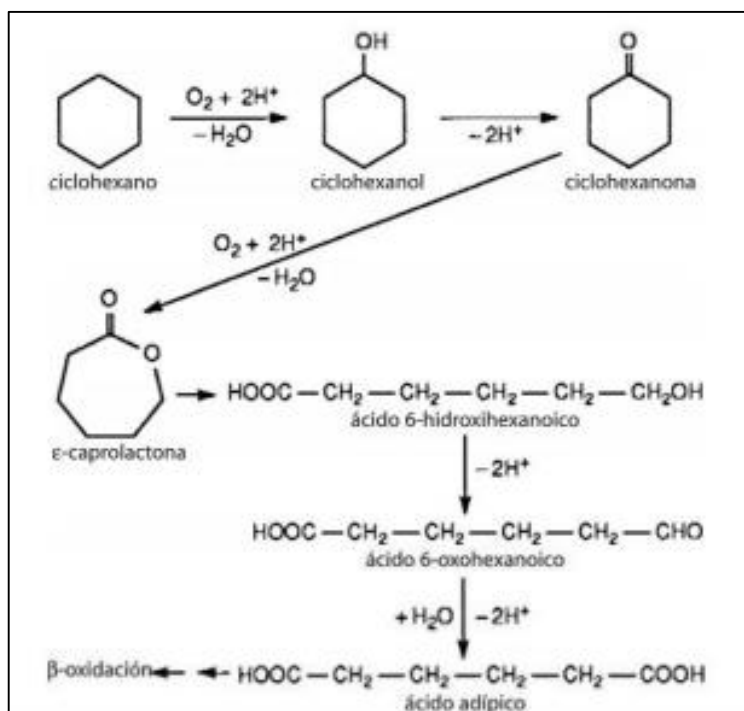


Figura 2. Oxidación microbiana del ciclohexano

Aromáticos

Estos hidrocarburos se oxidan mediante dioxigenasas a *cis*, *cis*-dihidrodiolés, que son inestables y se convierten espontáneamente en catecoles, el anillo aromático dihidroxilado se abre por una orto-escisión oxidativa y se origina un ácido *cis,cis*-mucónico, este ácido se metaboliza a ácido β -cetoadípico, el cual

se escinde oxidativamente y forma los intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico: ácido succínico y acetil-CoA. Otra posibilidad es que el anillo se escinda en la posición *meta*, adyacente a los grupos hidroxilo, y se produzca el semialdehído de 2-hidroxi *cis,cis*-mucónico. La continuación del proceso metabólico conduce luego a la formación de ácido fórmico, ácido pirúvico y acetaldehído (Figura 3)

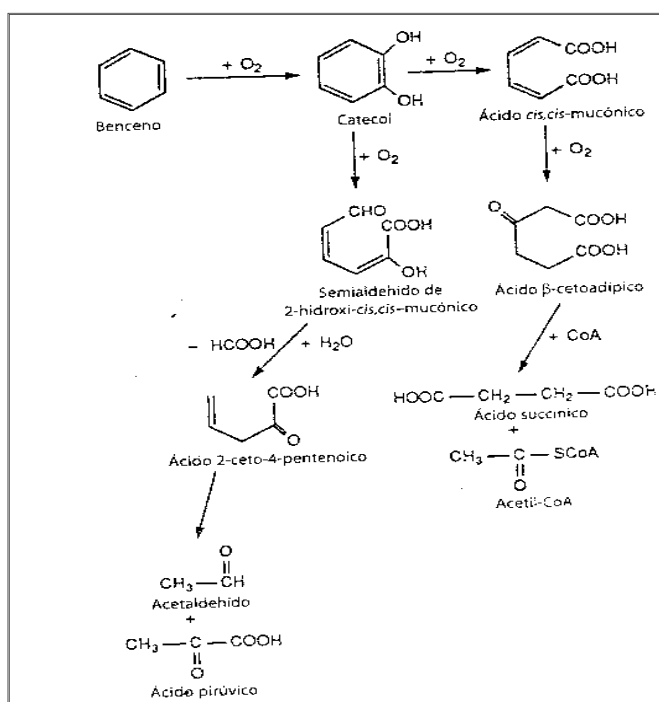


Figura 3. Escisión meta u orto del anillo aromático de benceno

Las estructuras formadas por anillos aromáticos condensados, si son degradables, son también atacadas por dihidroxilación, y se produce la apertura de uno de sus anillos; el anillo abierto es atacado de la misma forma (Figura 4), el catecol se metaboliza luego según lo descrito en la figura 3.

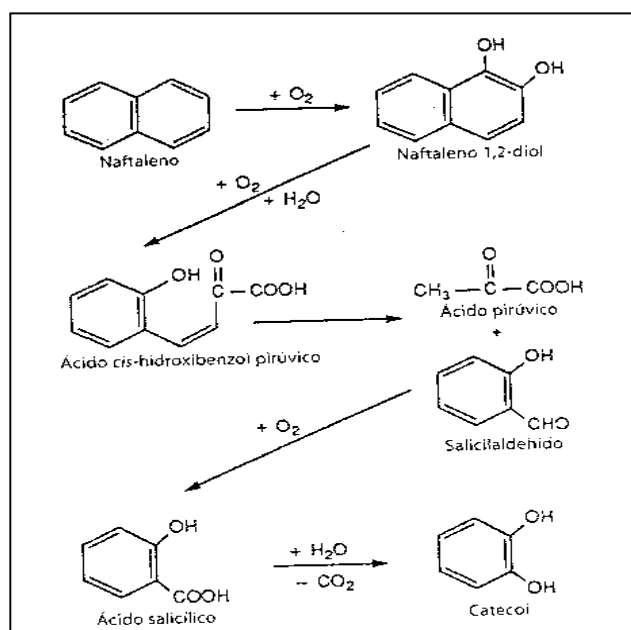


Figura 4. Metabolismo del naftaleno

Sin embargo, muchos compuestos aromáticos polinucleares condensados son muy resistentes a la degradación o totalmente refractarios, debido a que la inducción de las enzimas que realizan la degradación de estos compuestos, depende de la presencia de hidrocarburos aromáticos de bajo peso molecular.

2.4.2 Efectos de los surfactantes en la degradación de hidrocarburos

El rol fisiológico de los surfactantes en los microorganismos es facilitar el contacto de las células bacterianas con los sustratos hidrófobos; la superficie de la mayoría de las bacterias son hidrófilas, esto permite una interacción eficiente con sustratos solubles en agua, pero dificulta el contacto con sustratos hidrófobos como el petróleo. A pesar de esta dificultad existen un gran número de bacterias que pueden metabolizar el petróleo; ya que el sistema enzimático se encuentra en el citoplasma bacteriano, la habilidad de una cepa de asimilar los hidrocarburos depende principalmente de la capacidad de absorber estos sustratos hidrófobos (Matvyeyeva *et al.*, 2014). Existen al menos dos vías por la cual los surfactantes están involucrados en la degradación (Ron y Rosenberg 2002):

- ✓ La emulsificación es un fenómeno dependiente de la densidad celular, por lo cual a mayor número de células mayor concentración de productos extracelulares. Sin embargo en un sistema abierto, la concentración de células nunca alcanzaría un valor suficiente para emulsificar el petróleo eficientemente; además cualquier emulsificación estaría disponible para microorganismos competidores. Por lo cual se plantea que la emulsificación ocurre en o muy cerca de la superficie celular y no a nivel macroscópico, entonces cada grupo de celular crea su propio microambiente donde realiza la emulsificación necesaria para la degradación del petróleo.
- ✓ La baja solubilidad de muchos hidrocarburos, especialmente los hidrocarburos policíclicos aromáticos, es considerada como una limitante para su disponibilidad; cuando las moléculas orgánicas se unen irreversiblemente con las superficies inorgánicas la degradación es inhibida, los surfactante pueden desorber los hidrocarburos de las superficies incrementando su solubilidad.

2.5 Microorganismos degradadores de hidrocarburos

Es conocido que los hidrocarburos pueden ser descompuestos por bacterias, algas, hongos y levaduras. A pesar del hecho que estos organismos en los ecosistemas terrestres y acuáticos son ubícuos, el número de microorganismos heterotróficos que pueden utilizar los hidrocarburos es muy variable. Las más importantes bacterias en suelo y mar que puede utilizar hidrocarburos son *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas spp.* y *Corynebacterium sp.* (Matvyeyeva *et al.*, 2014). A continuación se revisan los géneros más frecuentes, *Pseudomonas* y *Bacillus*.

2.5.1 Genero *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* podría considerarse como el grupo bacteriano más diverso y significativo ecológicamente en el planeta, los miembros de este género han sido encontrados en todos los mayores ambientes naturales (terrestre, marino y agua dulce) así como en íntimas asociaciones con plantas y animales; esta distribución universal sugiere una gran capacidad de adaptabilidad fisiológica y genética. Esta diversidad surge por medio de la interacción de factores genéticos y ecológicos. Dentro de los factores ecológicos más importantes están: oportunidad ecológica, competencia, efecto de la productividad, disturbancia, parasitismo por fagos; entre los factores genéticos destacan la mutación y la recombinación. Si bien los factores genéticos son igual de significantes que las fuerzas ecológicas, son estas últimas las que determinan los patrones de diversidad (Spiers *et al.*, 2000).

La excepcional versatilidad nutricional de este género, acoplada con la producción de biosurfactante que puede movilizar hidrocarburos las hace candidatas excelentes para la bioremediación de hidrocarburos, así *P. aeruginosa* es frecuentemente aislada de suelos y agua subterránea contaminados con hidrocarburos, *P. putida* ha sido estudiada exhaustivamente por su capacidad de bioremediación de hidrocarburos aromáticos. Otras especies de *Pseudomonas* identificadas con propiedades para la remediación incluyen a *P. mendocina* y *P. stutzeri* (Silby *et al.*, 2011).

La bacteria gram-negativa *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista que normalmente está presente en el suelo y superficies en ambientes acuáticos. Su adaptabilidad y gran resistencia a los antibióticos le permite sobrevivir en un gran rango de condiciones naturales y artificiales (Gellatly y Hancock, 2013). El éxito de *P. aeruginosa* radica en su versatilidad y adaptabilidad codificada en su

genoma. Según los estudios genómicos realizados se conoce que esta bacteria presente un genoma largo (en un rango de 6.22 a 6.91 Mb) además que su genoma presenta regiones intercaladas conservadas conocidas como “regiones de plasticidad genómica”; *P. aeruginosa* tiene un genoma “core”, que contiene un juego de genes conservado y comprende como máximo el 90% del contenido genómico, y un genoma accesorio, que contiene genes que generalmente se encuentran en algunas cepas. Esto le permite una versatilidad metabólica que surge de la presión selectiva para la adaptación ambiental (Gellatly y Hancock, 2013).

2.5.2 Genero *Bacillus*

Una de la primeras bacterias en describirse fue *Vibrio subtilis* por Ehrenberg en 1835. En 1872, Cohn la renombro como *Bacillus subtilis*. Este organismo pertenece a unos de los más grandes y diversos géneros, distinguido por la producción de endoesporas. Las esporas fueron descritas por primera vez por Cohn en *B. subtilis* y luego por Koch en *Bacillus anthracis*. Cohn demostró la resistencia a la temperatura de las esporas de *B. subtilis* y Koch describió en *B. anthracis* el ciclo esporas, célula vegetativa, espora (Slepechy y Hemphill, 2006). Este género incluye un gran número de especies de interés, mayormente por su uso en aplicaciones biotecnológicas, el uso de las esporas como modelo para estudiar la diferenciación celular y resistencia a agentes descontaminantes, y el rol de ciertas especies como causantes de enfermedades humanas. Más de 300 especies del genero *Bacillus* han sido descritas como bacterias degradadoras de hidrocarburos (Bujang *et al.*, 2013), tanto en suelos (Das y Mukherjee, 2007) como en agua (Ismail y Dadrasnia, 2015).

B. subtilis puede ser aislado de distintos ambientes, terrestres y acuáticos, indicando que esta especie es ubicua y bien adaptada para crecer en diversas

condiciones. Sin embargo, como todos los miembros del género, *B. subtilis* es capaz de formar endosporas altamente resistentes en respuesta a la privación de nutrientes y otras condiciones de estrés. Consistentemente con el punto de vista que *B. subtilis* no es patógeno, no se han detectado genes que codifican algún factor de virulencia conocido en el secuenciamiento de su genoma, interesantemente el genoma codifica numerosas vías para la utilización de moléculas derivadas de plantas, reforzando la idea que esta especie esta en íntima asociación con las plantas (Earl *et al.*, 2008). Diversos estudios han reportado a *B. subtilis* como una especie con gran capacidad degradativa de hidrocarburos (Das y Mukherjee, 2007; Jabeen *et al.*, 2015; Jalilzadeh *et al.*, 2014).

2.6 Análisis de componentes principales (PCA)

En la sencillez conceptual del Análisis de componentes principales (PCA) reside su potencia para el tratamiento de datos compuestos por numerosas variables, en este sentido, el PCA se puede considerar una técnica de reducción de la información. Conceptualmente, su objetivo es tomar p variables correlacionadas (X_1, X_2, \dots, X_p) y encontrar combinaciones para generar otras nuevas variables (Z_1, Z_2, \dots, Z_p) que no estén correlacionadas (llamadas componentes principales). Estos componentes principales son ordenados de tal forma que Z_1 explique la mayor cantidad de variación contenida en los datos originales, seguida por Z_2 y así sucesivamente. Cuanto más dependientes sean las variables, más varianza será explicada por los primeros componentes, y la información contenida en los datos será mejor explicada por un número menor de componentes (Serrano, 2003). Debido a la capacidad de reducción de dimensionalidad de esta técnica, ha sido ampliamente utilizada en diversos campos, desde la sociología (Lozares y López, 1991), educación (Delgado, 2006) hasta el desarrollo de productos (Villarreal *et al.*, 2013), evaluación ambiental (Yengle, 2012), agronómica

(Restrepo *et al.*, 2012) además de su amplio uso en la ecología microbiana (Ramette, 2007).

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad hidrocarbonoclástica de un consorcio formulado a partir de bacterias aisladas de canchas de tratamiento de tierra contaminada con petróleo en Talara.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Evaluar la capacidad degradativa y emulsificante de las cepas bacterianas provenientes de Talara sobre hidrocarburos de petróleo.
- ✓ Seleccionar las cepas bacterianas con capacidad degradativa y emulsificante.
- ✓ Evaluar la actividad antagonista entre las cepas seleccionadas.
- ✓ Formular el consorcio a utilizar e identificarlo molecularmente.
- ✓ Evaluar la actividad del consorcio bacteriano formulado sobre la degradación de hidrocarburos de petróleo en medio líquido.

3.3 Hipótesis

Se puede formular un consorcio bacteriano con actividad hidrocarbonoclástica, a partir de canchas de tratamiento de tierra contaminada con petróleo, con potencial de mejorar la eficiencia de las técnicas de remoción de TPH.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Material biológico

Se seleccionaron 30 aislados pertenecientes al banco de cepas del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, las cuales fueron aisladas durante el 2002 de canchas de tratamiento de tierra contaminada con petróleo pertenecientes a la empresa PETROTECH, hoy SAVIA Perú, ubicada en Talara. Los aislados seleccionados se citan a continuación:

Tabla 3. Códigos de trabajo de aislamientos seleccionados para su evaluación

Código de aislamiento	Código de aislamiento
C3ACETC53	C12A42
C6PCB32	C11PC52
C8PCA52	C11BHI41
C8PCA14	C12CETRID4
C10BHID1	C12PCD21
C1BHIC5	C12PCB23
C10PCA43	C3PCA4
C10PCB42	C11BHII5
C11PC41	C2PCB51
C8PCD1	C4BHIA32
C10PCC12	C7BCB12
C10BHI1	C11BHI32
C6CETRIA12	C11BHI2
C10PCC11	C8PCA13
C10PCB5	C12PCD22

4.2 Evaluación primaria de cepas

4.2.1 Purificación y comprobación de actividad hidrocarbonoclástica.

Los 30 aislados se reactivaron en caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) y fueron incubadas por 12 horas, luego fueron centrifugadas a 5 000 rpm por 30 minutos,

el *pellet* se resuspendió en solución salina al 0,85% (SS) para centrifugarse nuevamente a 5 000 rpm por 15 minutos. Se preparó una suspensión a partir del *pellet* en SS con una turbidez de 0,5 escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ cel/mL), 1 mL de este inóculo se agregó a un tubo con 9 mL con medio mineral según Mills *et al.*, (1978) más crudo 2% e incubado hasta observar crecimiento microbiano.

Posteriormente, los cultivos que crecieron se estriaron en placa Petri con agar nutritivo (AN) para su purificación. Finalmente se separaron las cepas obtenidas (44 cepas) y se prepararon ceparios a partir de colonias aisladas. Todos los cultivos líquidos se incubaron a temperatura ambiente con agitación constante (150 rpm), mientras que los cultivos en placa a 37 °C.

4.2.2 Actividad hidrocarbonoclastica.

La actividad hidrocarbonoclastica de las 44 cepas se determinó por triplicado por medio del método utilizado por Merino, (1998), las cepas se incubaron por 12 horas en caldo BHI, luego se centrifugó a 5 000 rpm por 30 minutos, el *pellet* se resuspendió en SS para centrifugarse nuevamente a 5 000 rpm por 15 minutos. Se preparó una suspensión a partir del *pellet* en SS con una turbidez de 0,5 escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ cel/mL), 1 mL de este inóculo se agregó a un tubo con 9 mL de medio mineral según Mills *et al.*, (1978) más crudo 2% y se incubó por 3 días para lograr una adaptación al petróleo, luego de la incubación se agregó 1 mL del cultivo a un tubo con 9 mL de medio mineral según Mills *et al.*, (1978) más crudo 2% el cual fue incubado por 10 días.

Se midió el crecimiento cada 24 horas tomando en cuenta la turbidez comparada con la escala McFarland por medio de un densitómetro DEN-1. Todos los cultivos líquidos se incubaron a temperatura ambiente con agitación constante (150 rpm); la prueba se realizó por triplicado.

4.2.3 Perfil degradativo sobre hidrocarburos.

Se evaluó la capacidad degradativa de las 44 cepas sobre las diferentes fracciones que componen al crudo por medio del crecimiento en diferentes sustratos que representan los componentes del crudo, dichos sustratos fueron: Parafina líquida, borra, kerosene y gasolina de 84 octanos.

El crecimiento se determinó por medio del método utilizado por Merino, (1998), las cepas se incubaron por 12 horas en caldo BHI, luego se centrifugó a 5 000 rpm por 30 minutos, el *pellet* se resuspendió en SS para centrifugarse nuevamente a 5 000 rpm por 15 minutos. Se preparó una suspensión a partir del *pellet* en SS con una turbidez de 0,5 escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ cel/mL), 1 mL de este inóculo se agregó a un tubo con 9 mL de medio mineral según Mills *et al.*, (1978) más crudo 2% y se incubó por 3 días para lograr una adaptación al petróleo, luego de la incubación se agregó 1 mL del cultivo a un tubo con 9 mL de medio mineral según Mills *et al.*, (1978) con una de las diferentes fuentes de carbono.

Estos cultivos fueron incubados por 10 días; evaluándose el crecimiento por medio de la turbidez. Todos los cultivos líquidos se incubaron a temperatura ambiente con agitación constante (150 rpm); la prueba se realizó por duplicado.

4.2.4 Actividad emulsificante.

La actividad emulsificante fue evaluada a las 44 cepas de acuerdo a la metodología descrita por Escalante, (2002). Las cepas se incubaron por 12 horas en Caldo Nutritivo (CN), 1 mL se agregó a un tubo con 9 mL de medio mínimo de Goldman (Escalante, 2002) y se incubó por 7 días, posteriormente se centrifugó a 5 000 rpm por 30 minutos para colectarse el sobrenadante; al cual se adicionó 0,2 mL de crudo de petróleo para ser agitados manualmente durante

5 minutos para favorecer la formación de una emulsión. 5 mL de dicha emulsión fueron transvasados a celdas para su lectura en el espectrofotómetro a 540 nm. Finalmente la absorbancia leída fue convertida a Unidades de Actividad Emulsificante por mL (UAE/mL), siendo la absorbancia 0,816 el equivalente de absorbancia para una UAE/mL (Escalante, 2002). Todos los cultivos líquidos se incubaron a temperatura ambiente a 150 rpm; la prueba se realizó por triplicado.

4.3 Selección de las cepas

4.3.1 Pre-selección de las cepas.

En base a los resultados obtenidos se pre-seleccionaron las cepas que cumplieron con alguno de los siguientes criterios:

- ✓ Alta actividad degradativa del crudo.
- ✓ Buen crecimiento sobre las diferentes fracciones del petróleo.
- ✓ Alta actividad emulsificante.

Para la selección de las cepas se dividieron los datos en dos grupos: el primero, conformado por los resultados de actividad degradativa y crecimiento sobre diferentes sustratos y el segundo, conformado por los datos obtenidos de la prueba de actividad emulsificante. Dichos grupos recibieron un tratamiento estadístico diferenciado por la naturaleza de los datos obtenidos.

El primer grupo estuvo conformado por los resultados de crecimiento en crudo, borra, parafina, kerosene y gasolina de 84 octanos, los cuales adoptaron valores discretos, esto originó que los datos obtenidos no presenten varianza intragrupal imposibilitando la aplicación de un Análisis de Varianzas (ANOVA); sin embargo se utilizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) para identificar las cepas que presenten un comportamiento diferente con una matriz de varianza-covarianza, utilizando el primer y segundo componente como ejes X e Y

respectivamente, cabe mencionar que para la selección de los componentes se utilizó el valor de Jolliffe *cut-off*. Finalmente se evaluaron los datos de las cepas con comportamiento diferente.

El segundo grupo conformado por la actividad emulsificante de las cepas, se seleccionaron los 10 valores más altos, a razón de la gran diferencia observada (Grafica 6) entre estos valores y los reportados por el resto de cepas; esto permitió discriminar a los valores más bajos. Se aplicó un ANOVA para determinar si existen diferencias significativas entre los valores de los resultados obtenidos, luego mediante la prueba de Tukey y un gráfico de cajas se identificaron las cepas que se diferencian del resto.

4.3.2 Prueba de antagonismo entre las cepas pre-seleccionadas.

Se realizó la prueba de antagonismo a las cepas pre-seleccionadas mediante el método de la doble capa de Westerdahl *et al.*, (1991) modificado por León y García-Tello, (1988). Las cepas seleccionadas fueron sembradas como macrocolonias en Agar Nutricio incubadas a 37°C por 24 horas; en paralelo las mismas cepas (cepas testigo) fueron previamente reactivadas en Caldo Nutricio por 18-24 horas. Las pruebas de antagonismo se realizaron mediante la inoculación de 50 µl de cepas testigo (escala 0,5 McFarland) en 5 mL de caldo nutritivo semisólido la cual, después de una breve homogenización, se agregó a modo de “segunda capa” sobre los cultivos en placa, se dejó solidificar por 10 minutos y se incubó a 37°C por 24 horas, al cabo de ese tiempo se realizaron las lecturas correspondientes mediante la medida de los halos de inhibición. Cabe mencionar que se realizó el enfrentamiento de todas contra todas con la finalidad de descartar las cepas que presenten interacción negativa con las demás. El porcentaje de inhibición se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\%Inh = \frac{(H - C) \times 100}{H}$$

Donde:

H: Diámetro del halo de inhibición

C: Diámetro de la colonia.

En base a los resultados de la prueba de antagonismo se formuló el consorcio a utilizar en las siguientes fases.

4.4 Formulación del consorcio

Para poder formular el consorcio bacteriano se utilizó el resultado de la prueba de antagonismo entre las cepas pre-seleccionadas, con la finalidad de obtener un consorcio compuesto por las cepas que presenten los mejores resultados de actividad degradativa, emulsificante y crecimiento sobre diferentes sustratos, y que permitan ser cultivadas en un mismo medio.

4.4.1 Identificación molecular de las cepas

Las cepas fueron reactivadas en Caldo Luria Bertani, se incubaron por 24 horas a 37°C., se utilizó el Kit de Extracción Promega (Wizard® Genomic DNA Purification Kit) mediante el procedimiento descrito por el fabricante, una vez obtenido el ADN se amplificó el gen de ADN ribosomal 16S, para la realización del PCR se utilizó la siguiente proporción de reactivos y primers:

Tabla 4. Reactivos para PCR

	Concentración inicial	Concentración final	Vol. por reacción
Master Mix	-	-	20 µl
H₂O	-	-	12 µl
Primer F → 27F	10 µM	0,5 µM	2 µl
Primer R → 1492R	10 µM	0,5 µM	2 µl
ADN	-	-	4 µl
TOTAL			40 µl

- ✓ Primer 27 F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3')
- ✓ Primer 1492 R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3')

El ciclo de amplificación fue el siguiente:

- ✓ 94° C por 3 minutos
 - ✓ 94° C por 15 segundos
 - ✓ 55° C por 30 segundos
 - ✓ 72° C por 2 minutos
 - ✓ 72° C por 7 minutos
- } 30 ciclos

Se utilizó el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* para la edición de las secuencias, se descargaron las secuencias del NBLAST (NCBI) y se alinearon utilizando ClustalX V2.0.10, finalmente se usó MEGA V6.06 para la construcción del árbol filogenético, en el cual se usó la metodología de *Maximum Likelihood Bootstrap* de 1000 repeticiones.

4.5 Evaluación del consorcio

4.5.1 Cinética de crecimiento del consorcio

Se reactivaron las cepas seleccionadas del consorcio por 12 horas en caldo BHI; posteriormente, se realizó un escalamiento individual en una secuencia de volúmenes de 3 ml y 30 ml de CN, los cultivos de 30 ml se centrifugaron a 5 000 rpm por 30 minutos, los *pellets* se resuspendieron en SS para centrifugarse nuevamente a 5 000 rpm por 15 minutos. Se preparó una suspensión de 10 ml a partir de los 3 *pellets* en CN con una turbidez de 0,5 escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ cel/mL), finalmente se agregó a 270 ml de caldo Bushnell Haas con glucosa o petróleo al 3% como fuente de carbono. Las condiciones de incubación fueron a 35 °C con agitación de 140 rpm durante 2 días para la glucosa y 7 días para el petróleo.

Para el cálculo de la concentración bacteriana, se procesaron las muestras tomadas a lo largo del cultivo. Cada muestra, se sembró por dilución seriada y siembra por profundidad en *Agar Plate Count* (APC).

4.5.2 Degradación de hidrocarburos en medio líquido

Se reactivaron las cepas seleccionadas del consorcio por 12 horas en caldo BHI; posteriormente, se realizó un escalamiento individual en una secuencia de volúmenes de 3 ml y 30 ml de CN, los cultivos de 30 ml se centrifugaron a 5 000 rpm por 30 minutos, los *pellets* se resuspendieron en SS para centrifugarse nuevamente a 5 000 rpm por 15 minutos. Se preparó una suspensión de 10 ml a partir de los 3 *pellets* en CN con una turbidez de 0,5 escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ cel/mL), finalmente se agregó a 1000 ml de caldo Bushnell Haas con petróleo como fuente de carbono; adicionalmente se agregó medio Bushnell Haas cada semana para asegurar el crecimiento bacteriano continuo. Las condiciones de incubación fueron a 35 °C con aireación constante (flujo de 0,5 L/min) suministrada por una bomba de aire conectada por un filtro bacteriológico, para evitar contaminación ambiental, durante 42 días. Se preparó un control con aireación constante con las mismas condiciones para determinar la degradación abiótica ocurrida durante el ensayo.

Finalmente se enviaron los cultivos para la determinación de la concentración de hidrocarburos individuales (C10-C40) por el método EPA 3510C “Orgánicos no halogenados por cromatografía de gases” en el laboratorio de ALS CORPLAB S.A.C.

V. RESULTADOS

5.1 Evaluación primaria de cepas

5.1.1 Purificación y comprobación de actividad hidrocarbonoclástica.

Después de un periodo de almacenamiento aproximado de 10 años (2002 – 2011), se seleccionaron 30 aislados, de las cuales 3 aislados no reactivaron (10%) y 1 se descartó por tratarse de un hongo (3,3%); cabe mencionar que muchos de los aislados no se encontraban puros, por lo cual al final de esta etapa, se obtuvieron 44 cepas para evaluación. A continuación se presentan las cepas obtenidas.

Tabla 5. Datos de trabajo de las cepas evaluadas

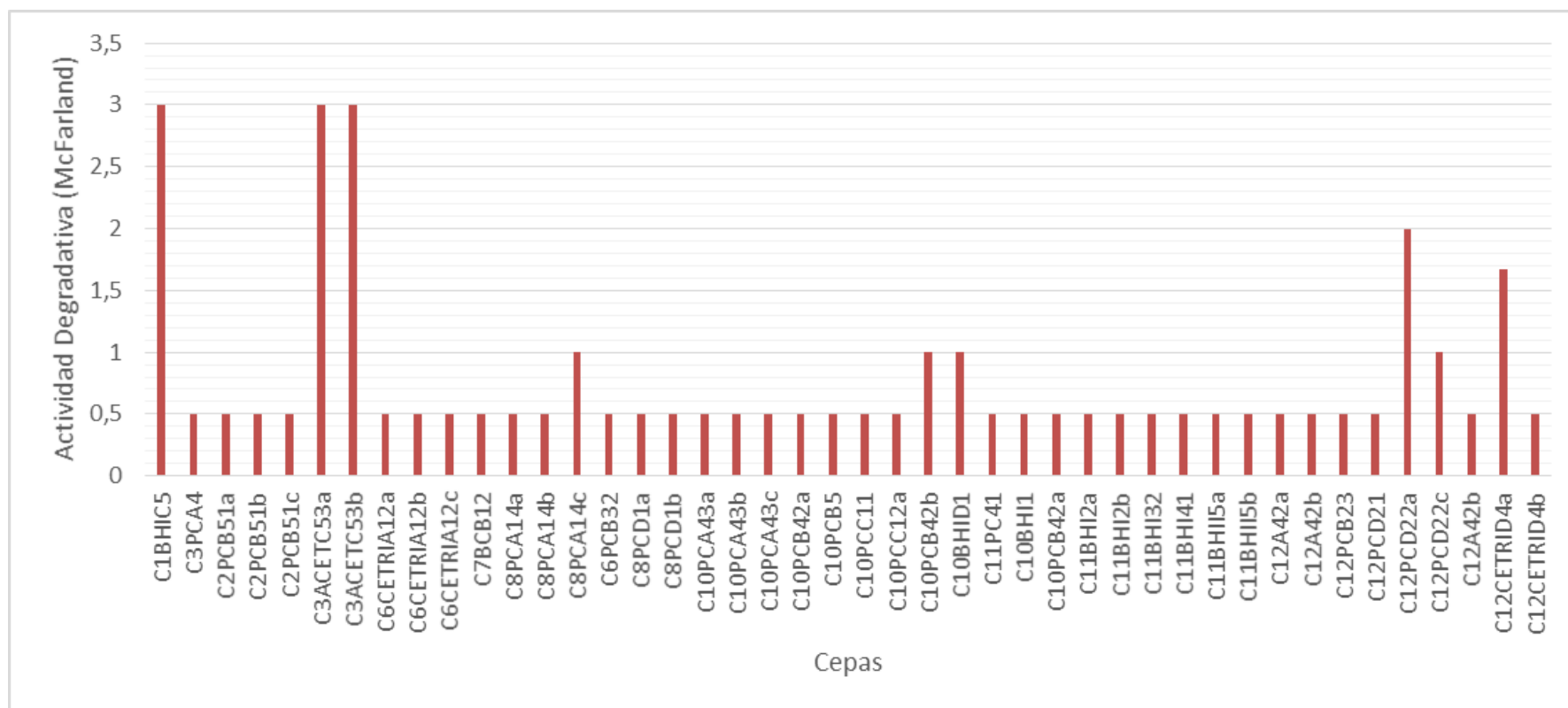
Código de aislamiento	Código de cepas obtenidas	Código de aislamiento	Código de cepas obtenidas
C3ACETC53	C3ACETC53a	C12A42	C12A42a
	C3ACETC53b		C12A42b
C12PCB23	C12PCB23	C11BHI41	C11BHI41
C12PCD21	C12PCD21	C12CETRID4	C12CETRID4a
C8PCA14	C8PCA14a		C12CETRID4b
	C8PCA14b	C1BHIC5	C1BHIC5
	C8PCA14c	C10BHID1	C10BHID1
C10PCA43	C10PCA43a	C3PCA4	C3PCA4
	C10PCA43b	C11BHII5	C11BHII5a
	C10PCA43c		C11BHII5b
C10PCB42	C10PCB42a	C2PCB51	C2PCB51a
	C10PCB42b		C2PCB51b
C11PC41	C11PC41		C2PCB51c
C8PCD1	C8PCD1a	C10PCC12	C10PCC12a
	C8PCD1b		C10PCC12b
C6CETRIA12	C6CETRIA12a	C12PCD22	C12PCD22a
	C6CETRIA12b		C12PCD22b
	C6CETRIA12c		C12PCD22c
C11BHI2	C11BHI2a	C7BCB12	C7BCB12
	C11BHI2b	C11BHI32	C11BHI32
C10BHI1	C10BHI1	C10PCC11	C10PCC11
C10PCB5	C10PCB5	C6PCB32	C6PCB32
C4BHIA32	No creció	C11PC52	No creció
C8PCA52	Hongo	C8PCA13	No creció

Fuente: elaboración propia

5.1.2 Actividad hidrocarbonoclastica.

La Tabla 6 muestra es crecimiento evaluado mediante la escala McFarland luego de los 10 días de incubación, donde se observa que las cepas C1BHIC5, C3ACETC53a, C3ACETC53b, C8PCA14c, C10PCC12b, C10BHID1, C12CETRID1a, C12PCD22a y C12PCD22b presentaron el mayor crecimiento superando la escala 1 de McFarland, cabe mencionar que fueron las cepas C1BHIC5, C3ACETC53a, C3ACETC53b las que mostraron un crecimiento

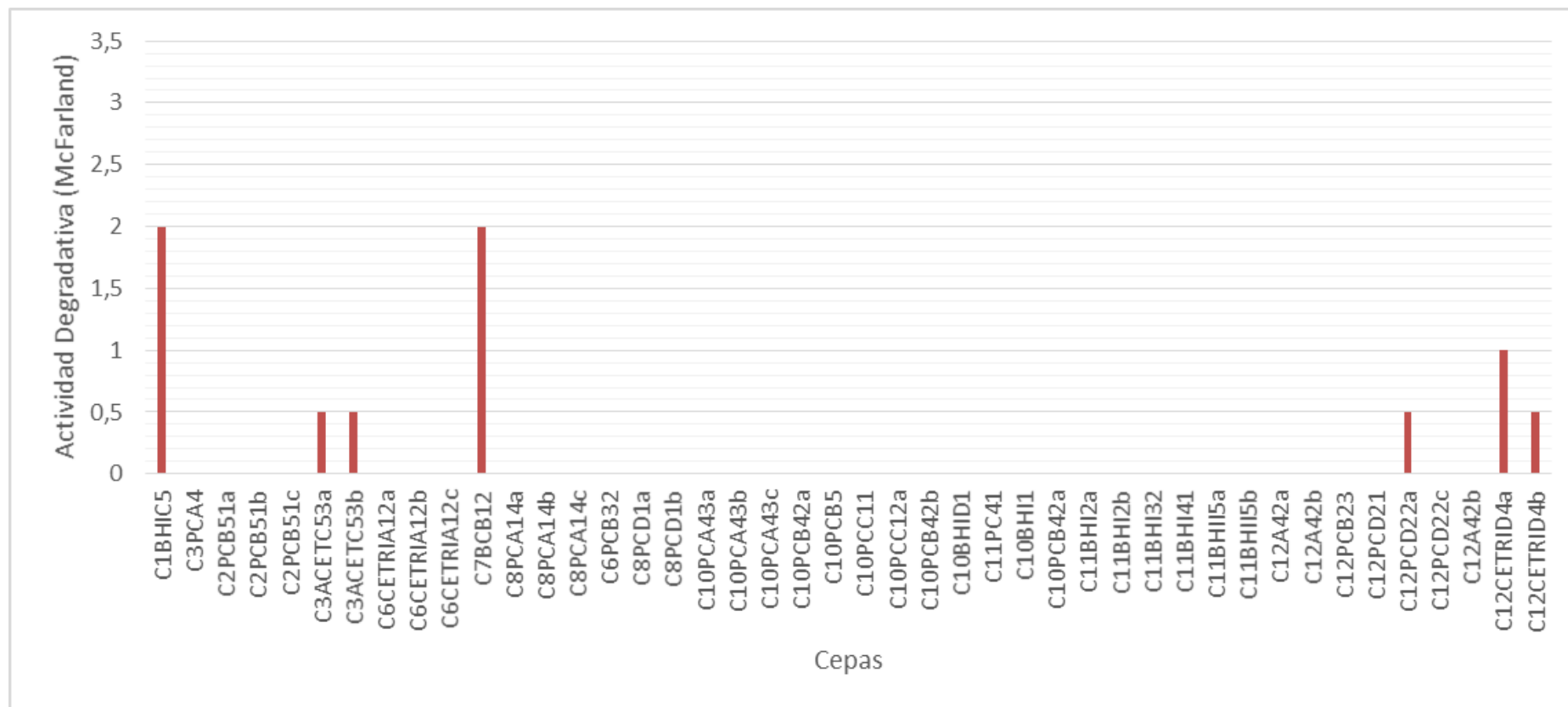
significativo con una escala 3 de McFarland. El 79,54% (35 cepas) no superó la escala 0,5 de McFarland luego de los 10 días de incubación.



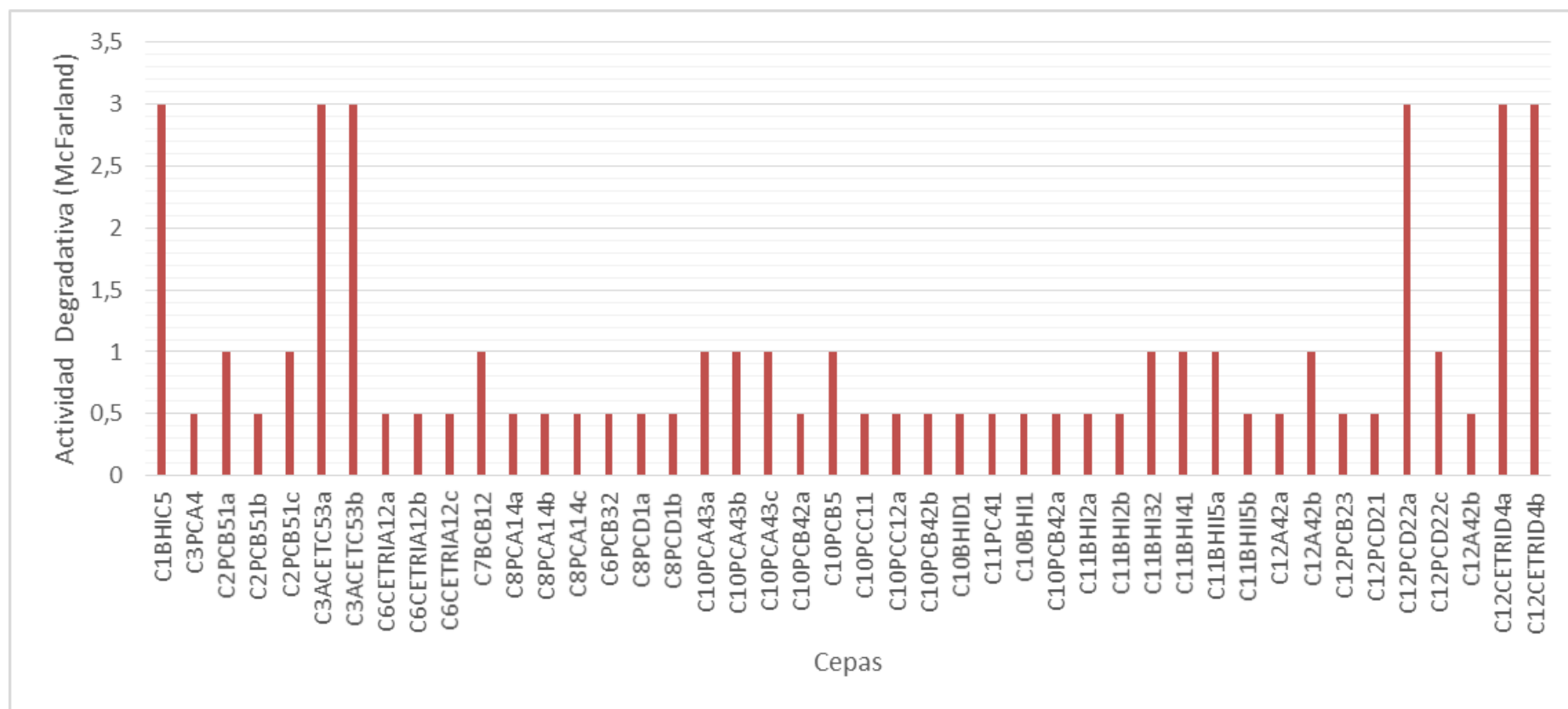
Grafica 1. Actividad degradativa sobre crudo de petróleo de las cepas evaluadas.

5.1.3 Perfil degradativo sobre hidrocarburos.

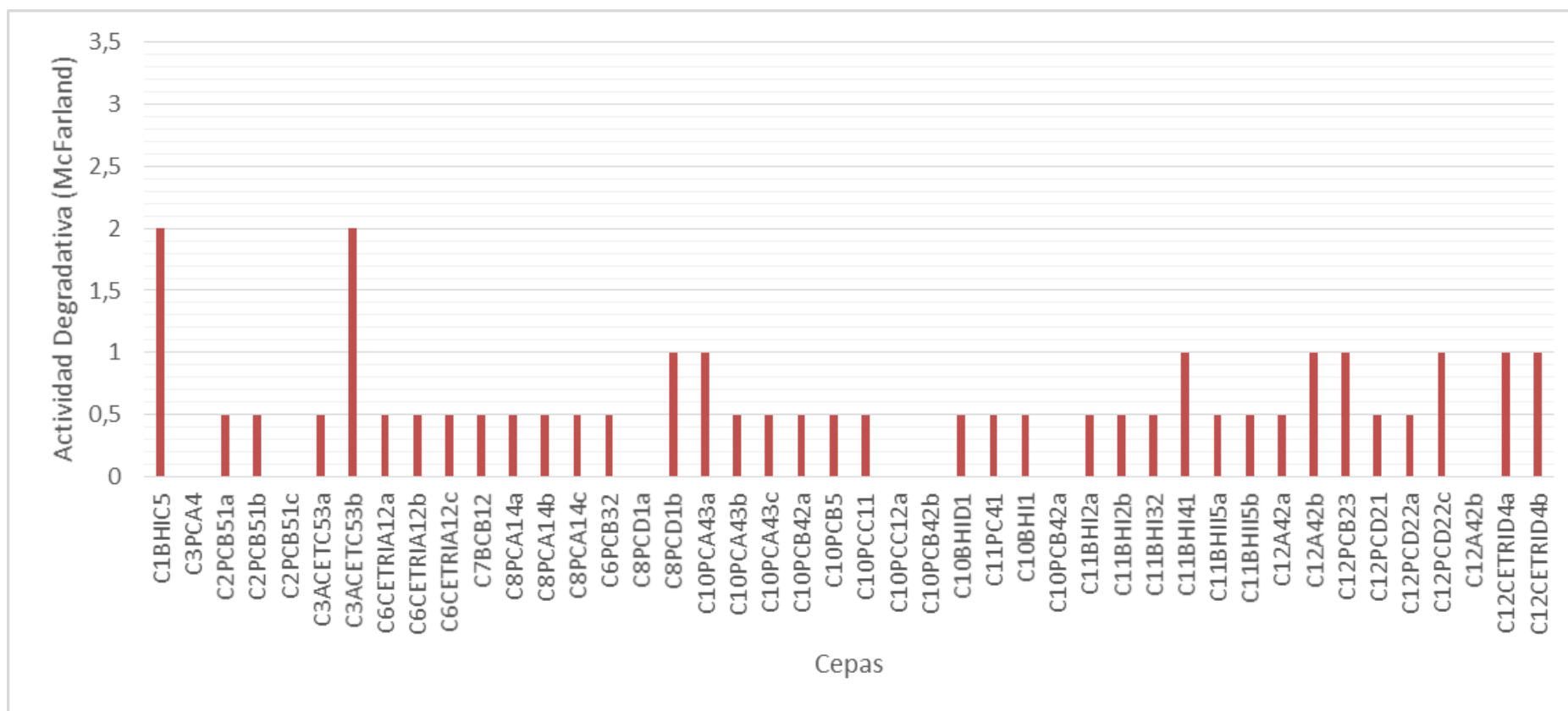
Se evaluó por duplicado el crecimiento de las 44 cepas sobre diferentes sustratos que representan las fracciones que componen al crudo. Los resultados obtenidos demuestran que la parafina y gasolina son las fuentes de carbono que soportaron el crecimiento de todas las cepas, además fueron los medios donde se alcanzó la mayor turbidez; se observa lo contrario cuando se utiliza borra como fuente de carbono, la cual solo permitió el crecimiento de 7 cepas mientras que el kerosene permitió el desarrollo de 38 cepas. A continuación se presenta a turbidez alcanzada por las 44 cepas luego de los 10 días de incubación.



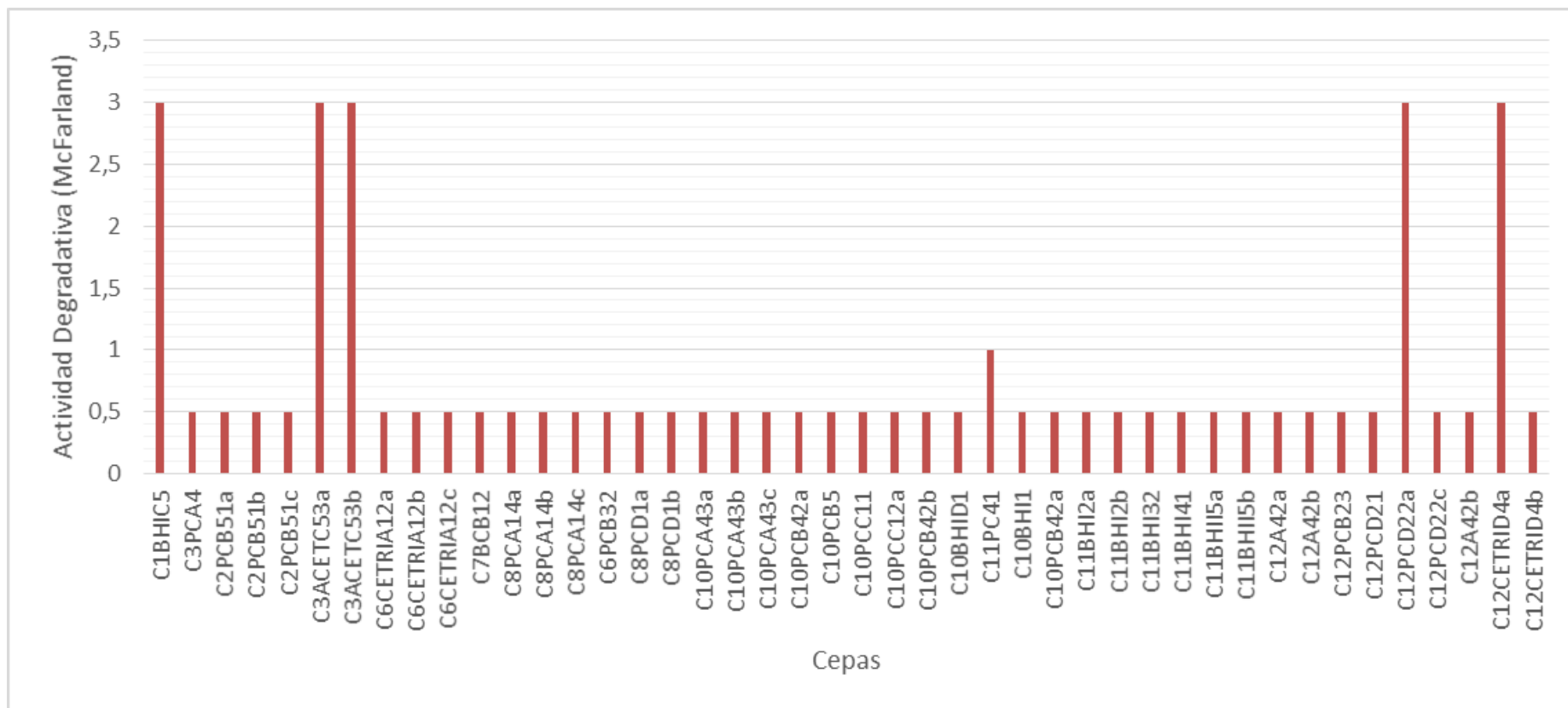
Grafica 2. Actividad degradativa sobre borra de las cepas evaluadas.



Grafica 3. Actividad degradativa sobre parafina de las cepas evaluadas.



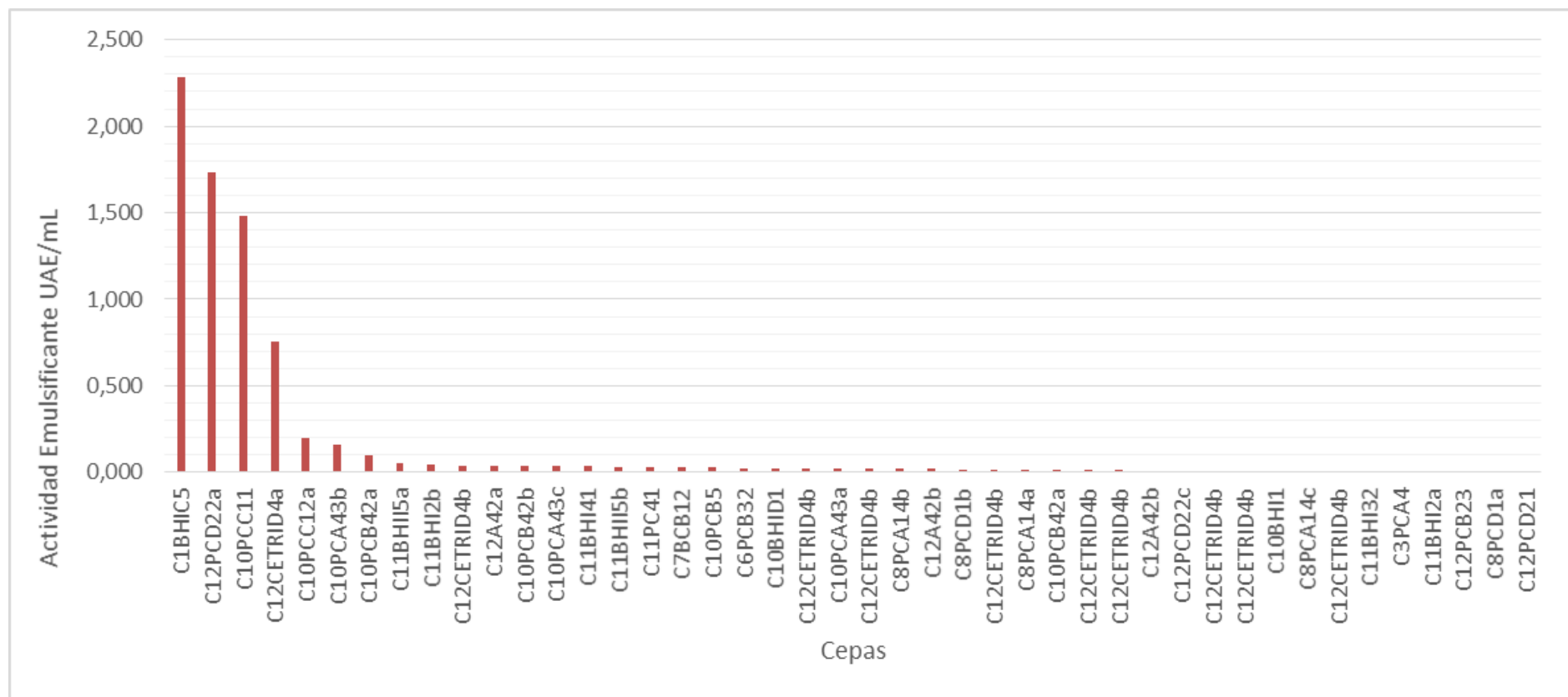
Grafica 4. Actividad degradativa sobre kerosene de las cepas evaluadas.



Grafica 5. Actividad degradativa sobre gasolina 84 octanos de las cepas evaluadas.

5.1.4 Actividad emulsificante.

La actividad emulsificante fue evaluada por triplicado para las 44 cepas obteniéndose un promedio de las UAE/mL correspondientes a su respectiva absorbancia. Los valores van desde 0,001 UAE/ml para la cepa 201 hasta 2,284 UAE/ml para la cepa 24, encontrándose el resto de las cepas dentro de ese rango, la distribución gráfica se presenta en la Grafica 6.



Grafica 6. Actividad emulsificante de las cepas evaluadas.

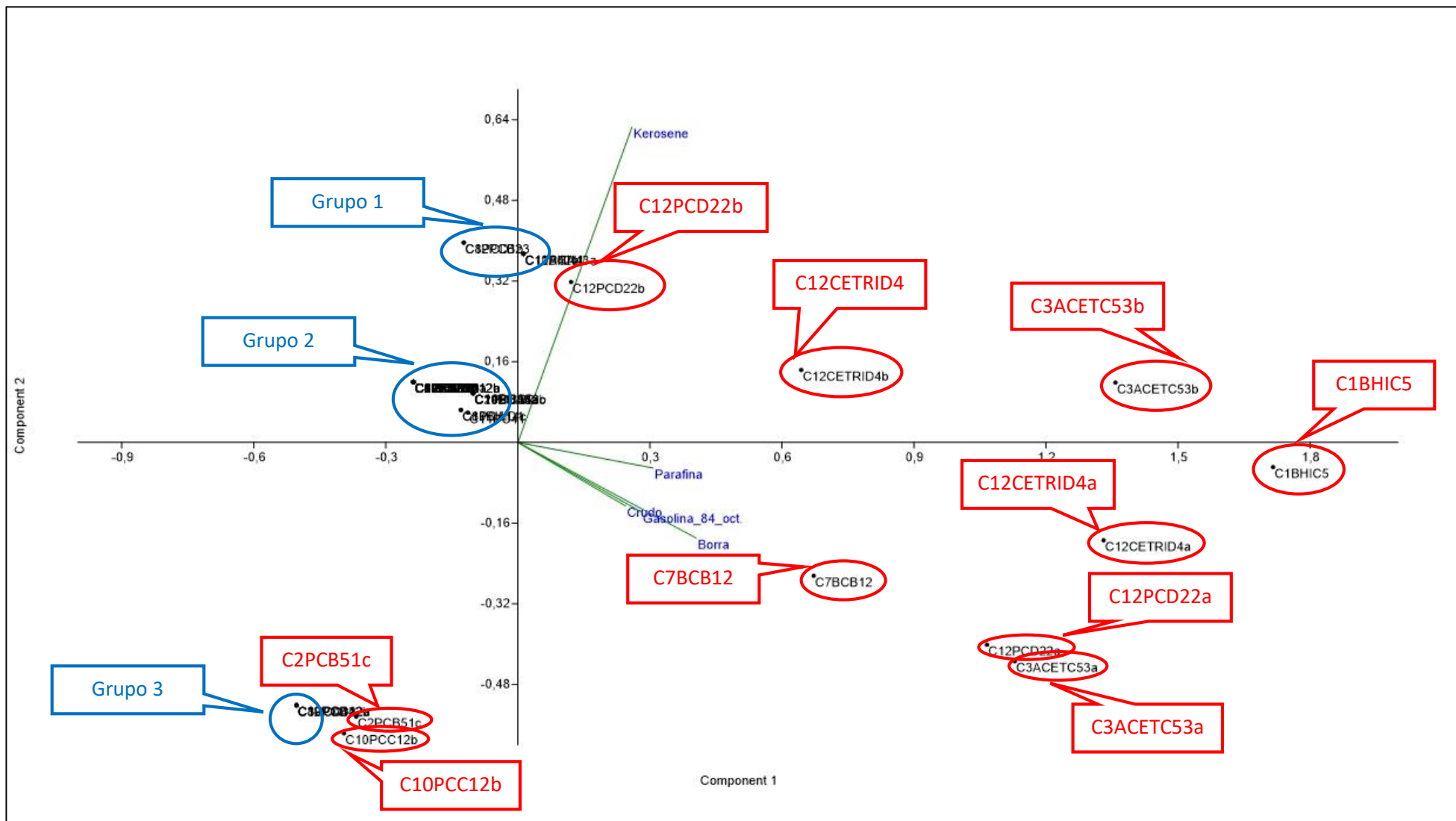
5.2 Selección de las cepas

5.2.1 Pre-selección de las cepas.

Para la pre-selección de las cepas se utilizó la información obtenida en los ensayos previos, dividiendo los datos en dos grupos, a continuación se presenta el tratamiento estadístico de cada uno de ellos.

El primer grupo, se conformó con los resultados del crecimiento en crudo, borra, parafina, kerosene y gasolina de 84 octanos; estos datos fueron procesados por medio de un Análisis de Componentes Principales (PCA), utilizando el primer y segundo componente como ejes X e Y respectivamente. Según lo observado en la Tabla 18 (Anexo), el primer y segundo componente tiene un Eigenvalue mayor al valor de Jolliffe cut-off, explicando el 86,70% de la varianza; por lo cual el primer y segundo componente se escogieron para la realización del *biplot*

A continuación se presenta el *biplot* resultante, se pueden identificar 3 grupos que agrupan a las cepas con comportamiento similar respecto al crecimiento sobre diferentes fuentes de carbono y a 10 cepas individuales (C7BCB12, C12PCD22b, C12CETRID4b, C12CETRID4a, C1BHIC5, C3ACETC53b, C12PCD22a, C3ACETC53a, C2PCB51c y C10PCC12b) que presentan un comportamiento diferente al resto, dichas cepas se encuentran remarcadas en rojo.



Grafica 7. Biplot de análisis de cepas para la preselección de cepas

Se evaluaron los datos de estas 10 cepas identificadas en el biplot, y se escogieron aquellas (6 cepas) que presentaron un crecimiento con turbidez superior o igual a 3 Mc Farland en el crudo o algunas de las fracciones.

Tabla 6. Resultados de las cepas con comportamiento diferente.

Cepa	Crudo	Borra	Parafina	Kerosene	Gasolina 84 oct.
C1BHIC5	3	2	3	2	3
C3ACETC53a	3	0.5	3	0.5	3
C3ACETC53b	3	0.5	3	2	3
C12PCD22a	2	0.5	3	0.5	3
C12CETRID4a	1.6	1	3	1	3
C12CETRID4b	0.5	0.5	3	1	0.5

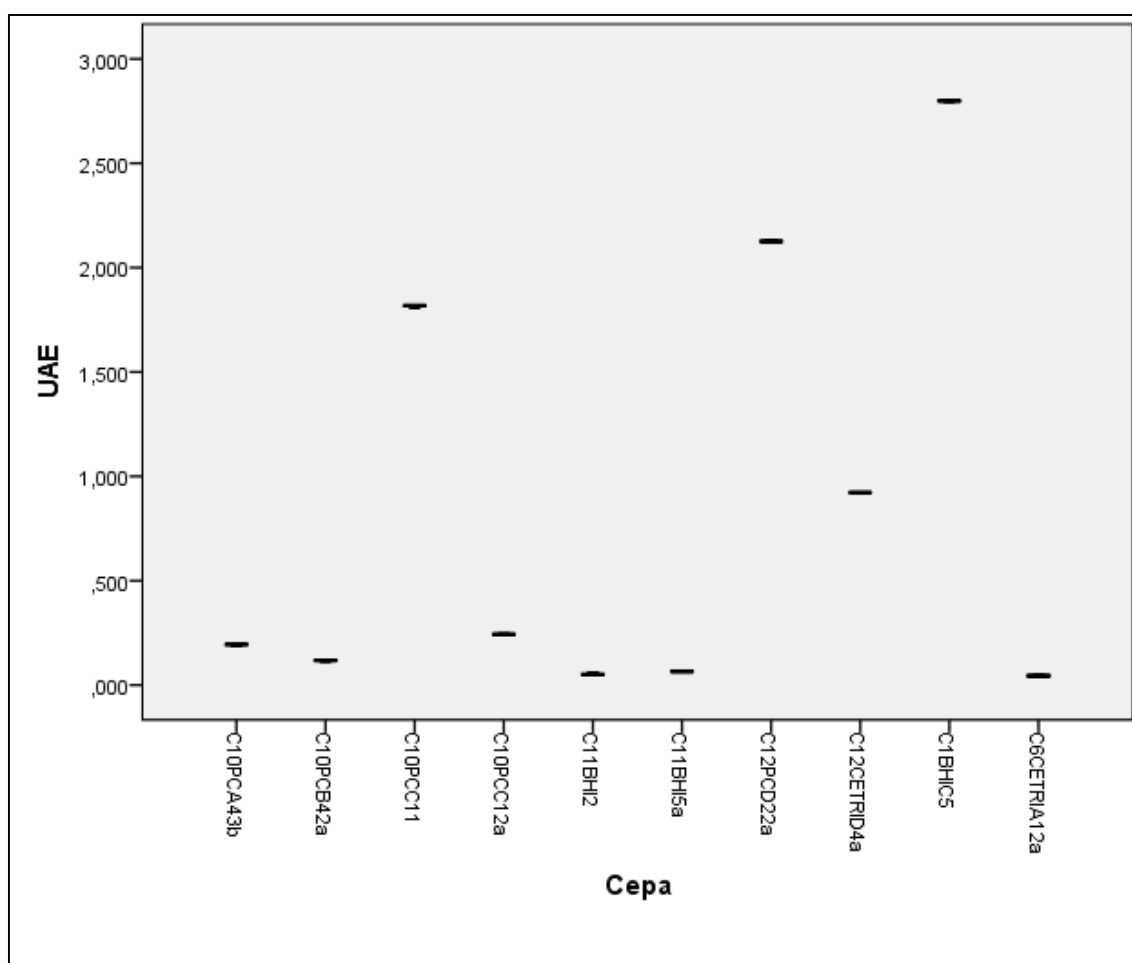
Para el segundo grupo de datos, se seleccionaron los 10 valores más altos de la actividad emulsificante, y se aplicó un ANOVA, previamente se comprobó su normalidad y homogeneidad.

Se empleó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks (Tabla 19) para comprobar la normalidad de los datos obtenidos; al obtener en todos los casos valores del estadístico Shapiro-Wilk por encima del $p < 0,05$, se comprobó la normalidad de la distribución de datos de cada cepa. Por lo cual se procedió a emplear la prueba de Levene (Tabla 20) para comprobar la homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos, al obtener el valor de significancia por encima de $p < 0,05$ se demostró la homogeneidad de las varianzas de los datos obtenidos, luego de comprobar la normalidad y homogeneidad se procedió al empleo de la prueba de ANOVA.

Se realizó la prueba de ANOVA (Tabla 21), y se obtuvo un valor de significancia por debajo del $p < 0,05$, con lo que se confirma que existen diferencias significativas entre la actividad emulsificante de las cepas. Sin embargo no se

conocen cual o cuales son las cepas que presentan dicha diferencia, por esta razón se utilizó la prueba de Tukey como una prueba de medias para determinar la diferencia entre las cepas.

La prueba de Tukey (Tabla 22) demostró que existen diferencias significativas entre las cepas; observándose 9 subconjuntos (A, B, C, D, E, F, G, H, I) diferentes, 2 de ellos (conformados por 2 cepas cada uno) presentaron diferencias de medias significativas. Una vez demostrada la diferencia de estas 4 cepas (C10PCC11, C12PCD22a, C1BHIC5 y C12CETRID4a) se realizó un gráfico de cajas para tener un ordenamiento visual de la actividad emulsificante.



Grafica 8. Gráfico de cajas de la actividad emulsificante

Según se observa en el Grafico 8, las cepas C10PCC11, C12PCD22a y C1BHIC5 son las que presentaron mayor UAE/ml.

Tabla 7. Datos de las cepas con mayor UAE/ml.

Cepa	UAE/ml
C1BHIC5	2,284
C10PCC11	1,481
C12PCD22a	1,736

En base al análisis realizado del crecimiento de las cepas en crudo, borra, parafina, kerosene y gasolina de 84 octanos (Tabla 6) y de la actividad emulsificante (Tabla 7) se pre-seleccionaron 7 cepas:

Tabla 8. Características de las cepas pre seleccionadas.

Cepa	Crudo	Borra	Parafina	Kerosene	Gasolina 84 oct.	UAE/ml
C1BHIC5	3	2	3	2	3	2,284
C3ACETC53a	3	0,5	3	0,5	3	0,011
C3ACETC53b	3	0,5	3	2	3	0,007
C12PCD22a	2	0,5	3	0,5	3	1,736
C12CETRID4a	1,6	1	3	1	3	0,753
C12CETRID4b	0,5	0,5	3	1	0,5	0,016
C10PCC11	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,481

5.2.2 Prueba de antagonismo entre las cepas pre-seleccionadas.

Se realizaron las pruebas de antagonismo a las cepas preseleccionadas, calculando el porcentaje de inhibición entre ellas, dichos porcentajes se presentan a continuación:

Tabla 9. Porcentaje (%) de inhibición entre cepas pre-seleccionadas.

		Cepas testada						
		C3ACET C53b	C12CETRI D4b	C12PCD2 2a	C12CETR ID4a	C1BHIC5	C3ACETC 53a	C10PCC1 1
Cepa que inhibe	C3ACETC53b	X	0	0	0	0	0	0
	C12CETRID4b	0	X	44,4	0	0	0	0
	C12PCD22a	0	0	X	0	0	0	57,9
	C12CETRID4a	0	0	10	X	0	0	0
	C1BHIC5	0	0	45	45	X	0	0
	C3ACETC53a	0	23	44,4	55,5	0	X	0
	C10PCC11	0	0	0	0	0	0	X

Según los resultados de la prueba de antagonismo, se puede observar que existen 2 cepas (C3ACETC53b y C10PCC11) que no inhiben el crecimiento de ninguna otra cepa testada; mientras que la cepa C3ACETC53a inhibe a la mayor cantidad de cepas (3 cepas distintas) y no es inhibida por ninguna.

5.3 Formulación del consorcio

5.3.1 Formulación del consorcio

Según la evaluación de los resultados de la prueba de antagonismo, entre las cepas pre-seleccionadas, se escogieron las siguientes cepas:

- ✓ Cepa C1BHIC5, ya que no es inhibida por ninguna otra cepa y cuenta con los mejores resultados de actividad degradativa y crecimiento sobre diferentes sustratos, además de tener la mayor actividad emulsificante.
- ✓ Cepa C3ACETC53a, ya que no es inhibida por ninguna otra cepa y cuenta con un buen resultado en la actividad degradativa y es capaz de crecer sobre parafina y gasolina 84 oct.
- ✓ Cepa C3ACETC53b, ya que no es inhibida por ninguna otra cepa y cuenta con un buen resultado en la actividad degradativa y es capaz de crecer sobre parafina y gasolina 84 oct. y kerosene

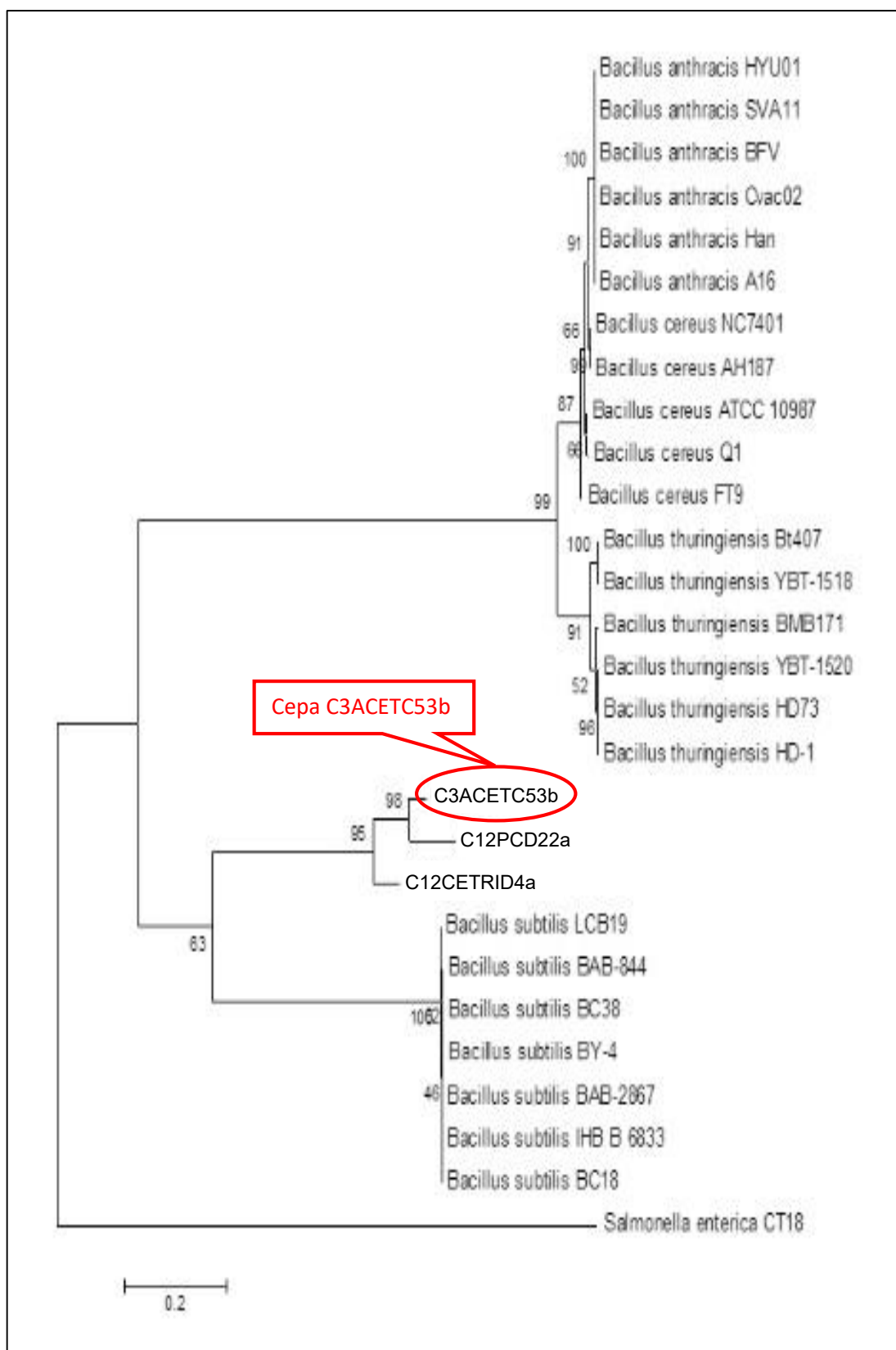
Las mismas que conformaran el consorcio bacteriano utilizado para la remoción de hidrocarburos en medio líquido.

5.3.2 Identificación molecular de las cepas

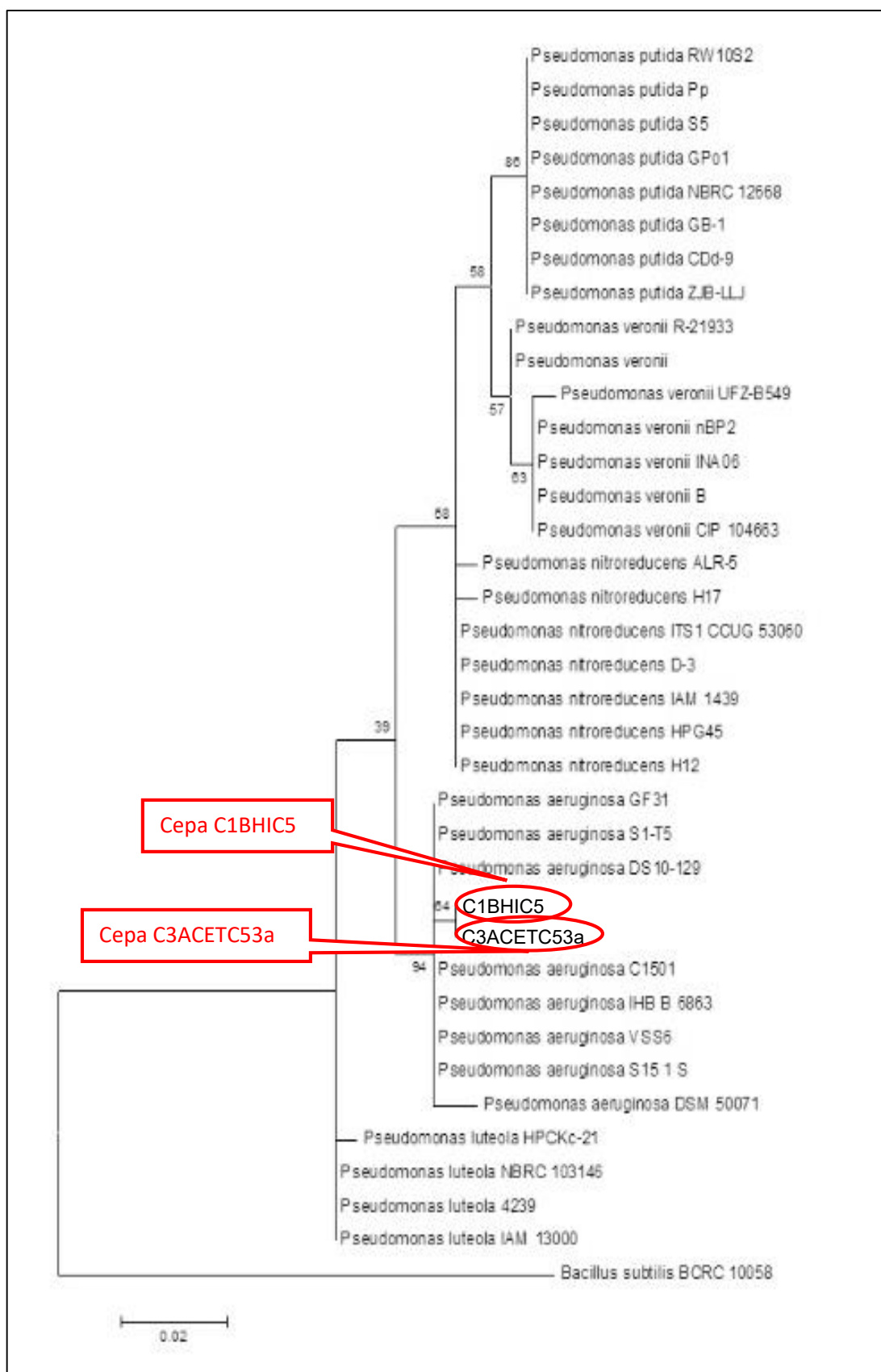
Según los resultados de la amplificación del gen del RNA ribosomal 16S, se puede afirmar que las cepas están relacionadas a las especies *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* de acuerdo al método *Maximum Likelihood Bootstrap* de 1000 repeticiones, las cepas seleccionadas para el consorcio son:

- ✓ **C1BHIC5:** *Pseudomonas aeruginosa*.
- ✓ **C3ACETC53a:** *Pseudomonas aeruginosa*.
- ✓ **C3ACETC53b:** *Bacillus subtilis*.

A continuación se presentan los arboles filogenéticos de las cepas identificadas.



Grafica 9. Árbol filogenético basado en secuencias del gen 16S ARNr de cepa C3ACETC53b



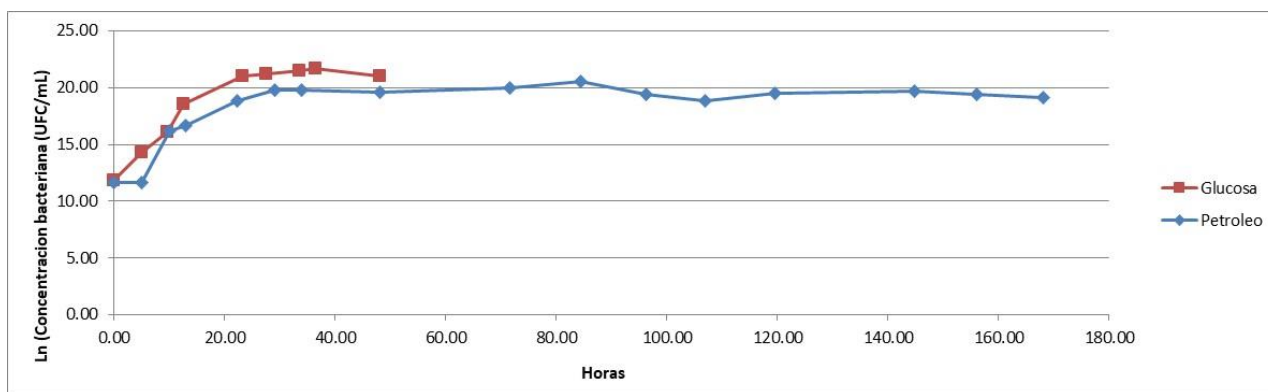
Grafica 10. Árbol filogenético basado en secuencias del gen 16S ARNr de cepa C1BHIC5 y C3ACETC53a

5.4 Evaluación del consorcio

5.4.1 Cinética de crecimiento del consorcio

Se realizaron las cinéticas de crecimiento del consorcio bacteriano utilizando glucosa o petróleo al 3% como fuente de carbono, ambos se cultivaron hasta las 48 horas con mediciones cada 4-5 horas aproximadamente, adicionalmente el cultivo con petróleo se mantuvo hasta las 168 horas con mediciones cada 12 horas aproximadamente.

La cinética de crecimiento del consorcio presentó comportamiento diferente en las dos fuentes de carbono evaluadas. A continuación se presentan las curvas de crecimiento en cada medio de cultivo. Para la comprensión de estas cinéticas se calculó la constante específica de velocidad de crecimiento (μ), biomasa máxima obtenida (B_{max}), tiempo de generación (g) y número de generaciones.



Gráfica 11. Cinética de crecimiento del consorcio en glucosa y petróleo

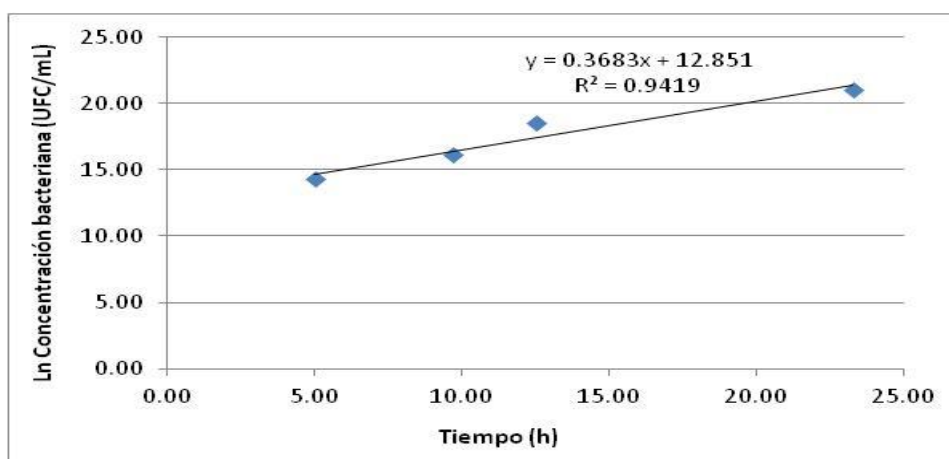
Claramente se puede observar una diferencia entre las cinéticas de crecimiento en función a la fuente de carbono utilizada. Al utilizar glucosa se obtiene una velocidad de crecimiento (0.53 generaciones/hora) mayor a la obtenida con petróleo (0.43 generaciones/hora), esto origina un tiempo de generación menor y una consecuente mayor biomasa; cabe mencionar que la duración de la fase exponencial son similares para ambas fuentes de carbono (23.27 horas para la

glucosa y 24 horas para el petróleo), además al utilizar glucosa no se presenta la fase Lag como si se aprecia con el petróleo (fase Lag de 5 horas)

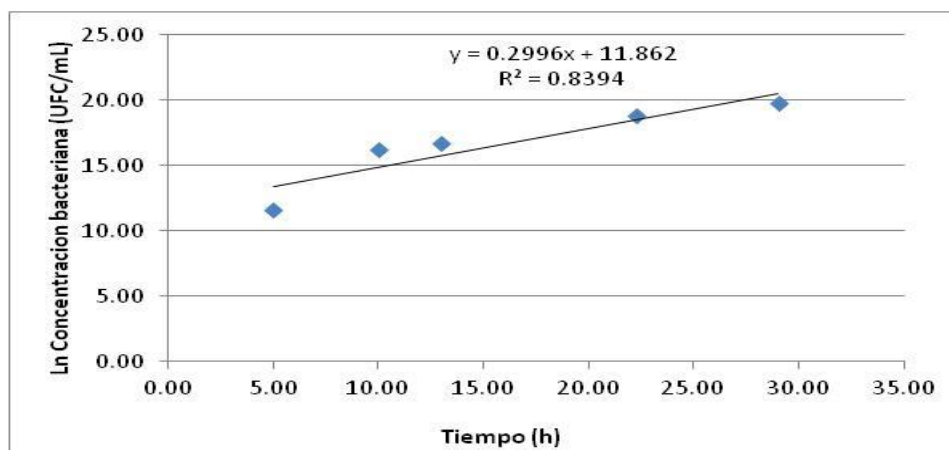
Tabla 10. Parámetros de curva de crecimiento del consorcio en las dos fuentes de carbono.

Parámetros	Glucosa	Petróleo
Bmax (UFC/mL)	2.60E+09	8.1E+08
μ (hora ⁻¹)	0.37	0.30
g (hora)	1.88	2.31
k (generaciones/hora)	0.53	0.43

A continuación se presentan los resultados de las curvas de crecimiento realizadas.



Gráfica 12. Linealización de la fase logarítmica de la concentración bacteriana vs. Tiempo – glucosa 3%



Gráfica 13. Linealización de la fase logarítmica de la concentración bacteriana vs. Tiempo - petróleo 3%.

5.4.2 Degradación de hidrocarburos en medio líquido

Se evaluó la degradación del consorcio bacteriano sobre los hidrocarburos presentes en el petróleo crudo en un medio líquido, cultivado por 42 días con aireación constante. Se utilizó una concentración inicial de 31 768 mg/L de TPH (C11 – C40) determinado por el método EPA 3510 C (Nonhalogenated organic by gas chromatography), a continuación los resultados (ALS LS Perú, 2019).

Tabla 11. Degradación de hidrocarburos totales del petróleo por el consorcio y control abiótico luego de 42 días de incubación.

	Control abiótico	Consortio definido
TPH inicial (mg/L)	31768,94	
TPH final (mg/L)	9567,10	1545,71
Reducción de TPH (mg/L)	22201,84	30223,23
% de reducción	69,89	95,13
% de reducción efectiva	-	25,25

Se obtuvo un porcentaje de reducción del 95,13% luego de 42 días de incubación en el ensayo con el consorcio definido mientras que se obtuvo un 69,89% de reducción en el control abiótico; esto da un porcentaje de reducción de 25,25% atribuible a la degradación microbiana por el consorcio definido. A

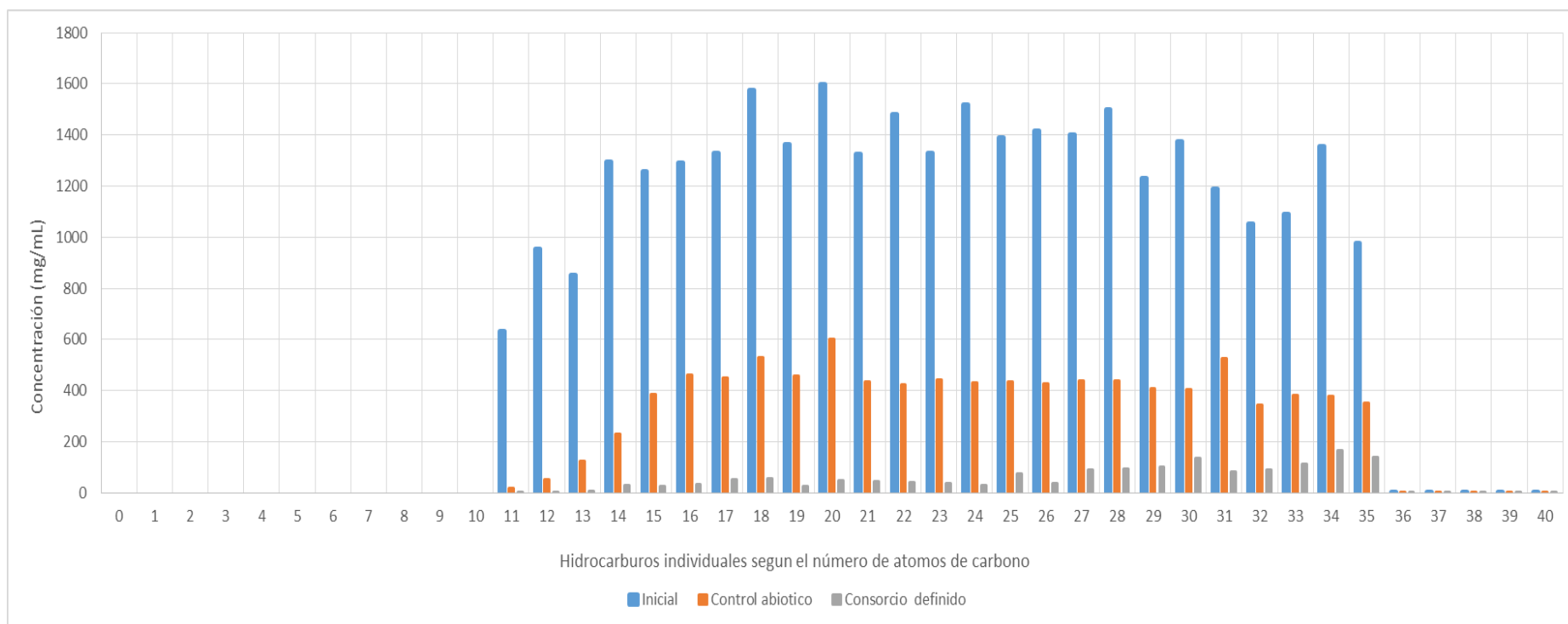
continuación se presentan las concentraciones individuales de cada hidrocarburo según el número de átomos de carbono en los ensayos.

Tabla 12. Concentraciones individuales de los hidrocarburos según el número de átomos de carbono en los ensayos.

Parámetro	Inicial	Control abiótico	Consortio definido
n-Undecano (C11)	630,19	18,52	0,03
n-Dodecano (C12)	952,71	52,14	0,03
n-Tridecano (C13)	849,53	125,7	8,29
n-Tetradecano (C14)	1295,58	228,95	29,36
n-Pentadecano (C15)	1258,08	386,93	26,01
n-Hexadecano (C16)	1289,15	460,32	33,47
n-Heptadecano (C17)	1329,74	450,61	50,82
n-Octadecano (C18)	1576,86	529,27	54,81
n-Nonadecano (C19)	1363,84	456,4	25,09
n-Eicosano (C20)	1599,59	602,97	48,66
n-Heneicosano (C21)	1325,66	435,53	44,48
n-Docosano (C22)	1481,09	421,34	40,35
n-Tricosano (C23)	1328,06	440,66	35,92
n-Tetracosano (C24)	1519,04	432,6	28,55
n-Pentacosano (C25)	1390,2	432,68	74,58
n-Hexacosano (C26)	1414,62	425,46	38,47
n-Heptacosano (C27)	1401,72	436,49	88,72
n-Octacosano (C28)	1497,49	439,61	93,07
n-Nonacosano (C29)	1230,06	407,79	100,17
n-Triacontano (C30)	1374,58	406,02	135,02
n-Hentriacontano (C31)	1189,52	524,65	82,17
n-Dotriacontano (C32)	1051,06	344,92	90,09
n-Tritriacontano (C33)	1090,42	380,29	113,16
n-Tetratriacontano (C34)	1354,94	377,13	164,29
n-Pentatriacontano (C35)	975,06	349,97	139,95
n-Hexatriacontano (C36)	0,03	0,03	0,03
n-Heptatriacontano (C37)	0,03	0,03	0,03
n-Octatriacontano (C38)	0,03	0,03	0,03
n-Nonatriacontano (C39)	0,03	0,03	0,03
n-Tetracontano (C40)	0,03	0,03	0,03

La reducción de las concentraciones de los hidrocarburos totales de petróleo se puede observar claramente en el siguiente grafico donde se pierden los picos

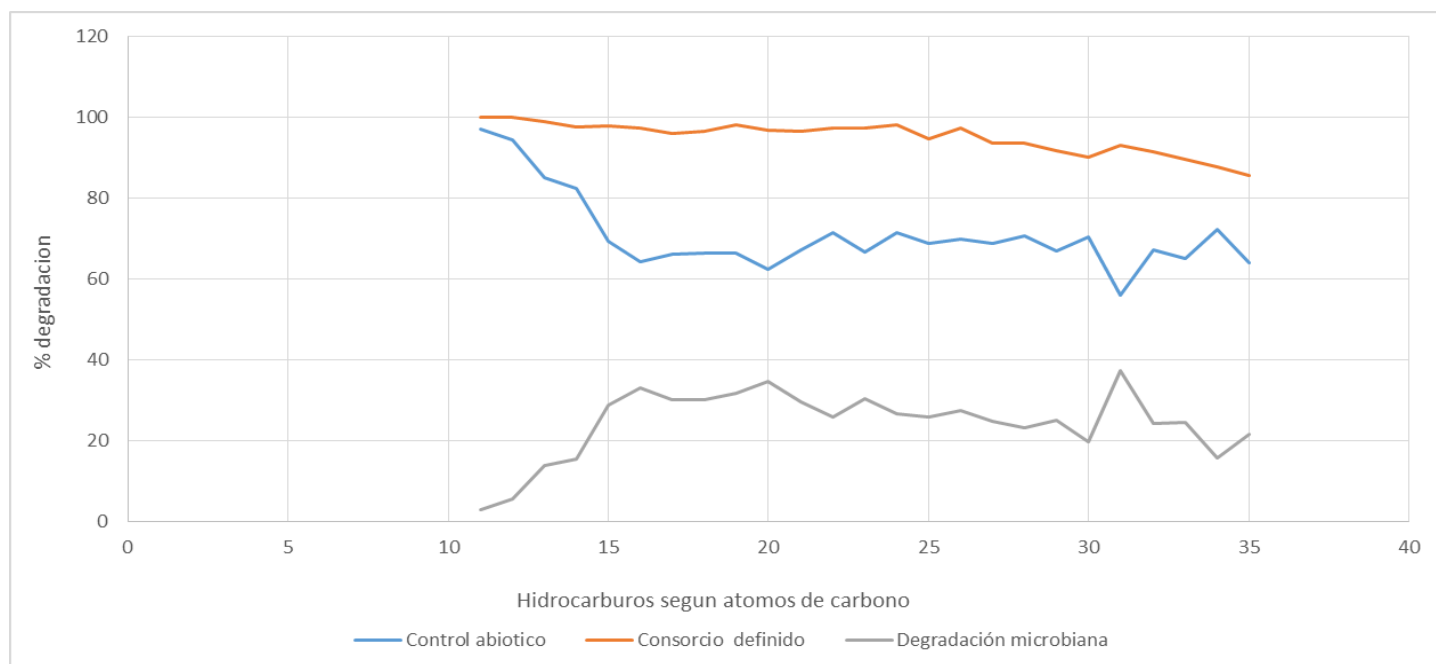
iniciales característicos del petróleo crudo no degradado (Grafica 14) luego de 42 días de incubación.



Grafica 14. Concentraciones individuales de los hidrocarburos totales de petróleo inicial y final en los ensayos control abiótico y consorcio definido.

Se determinó el porcentaje de reducción de cada hidrocarburo individual obtenido en el control abiótico y luego de la incubación con el consorcio definido (Tabla 17, Anexo 9.1). Se puede observar que todos los porcentajes de degradación en el ensayo con el consorcio definido son superiores a los observados en el control abiótico; sin embargo se aprecian ciertas diferencias en cada ensayo, en el ensayo del control abiótico la mayor reducción se presenta en los hidrocarburos de menor número de carbonos y luego la reducción se mantiene constante en el resto de hidrocarburos, mientras que en el consorcio definido el porcentaje de reducción se reduce conforme aumenta el peso molecular de los hidrocarburos.

La reducción atribuible a la degradación bacteriana por el consorcio definido se mantiene constante entre el 25% y 30% a partir del hidrocarburo tridecano (C13) en adelante; mientras que con hidrocarburos de menor peso molecular presentan porcentajes de degradación bastante bajos.



Grafica 15. Porcentaje de degradación de cada hidrocarburo individual según el número de átomos de carbono luego de 42 días de incubación.

VI. DISCUSIONES

6.1 Evaluación de la capacidad degradativa y emulsificante de las cepas bacterianas sobre hidrocarburos de petróleo

Actividad hidrocarbonoclastica

Si bien existen numerosas metodologías para evaluar la capacidad hidrocarbonoclastica de las cepas bacterianas, todas se basan en el enfrentamiento de los microorganismos con el petróleo; para lograrlo, los métodos se dividen en: los que utilizan un medio líquido (Merino *et al.*, 2015; Ricoy *et al.*, 2012; Barrios-San Martín *et al.*, 2012) y un medio sólido (Echeverri *et al.*, 2010; Hassanshahian *et al.*, 2012; Hassanshahian *et al.*, 2014). En el presente trabajo se evaluó la actividad degradativa a través del crecimiento de las cepas en un medio líquido con crudo.

Al evaluarse el crecimiento de las 44 cepas sobre petróleo, se obtuvo que el 6,82% (3 cepas) alcanzó la escala número 3 de McFarland, el 20,45% (9 cepas) superó la escala número 1 de McFarland, mientras que el 79,54% (35 cepas) no superó la escala número 0,5 de McFarland; estos resultados coinciden con lo reportado por Escalante, (2002) y Samanez, (2008) quienes obtuvieron un valor máximo de crecimiento comparable con la escala número 3 de McFarland, sin embargo fueron menores a lo descrito por Arenas, (1999) que reportó valores de crecimiento en la escala número 5 de McFarland.

Es conocido que en el proceso de remediación existen 2 fases muy marcadas: una fase inicial de degradación rápida seguida de una fase de degradación lenta, con poblaciones bacterianas características para cada fase con diferentes grados de actividad degradativa (Kaplan y Kitts, 2004) esto explica la diferencia

entre los resultados encontrados: ya que, mientras las cepas estudiadas fueron aisladas en las etapas finales de tratamiento; Arenas, (1999) realizó el aislamiento en tierra con contaminación crónica de petróleo sin tratamiento donde los continuos derrames permiten que diferentes poblaciones se encuentren en la fase inicial de degradación.

Narváez-Flórez *et al.*, (2008) reportó que una concentración del 2% de crudo inhibe el crecimiento del 50% de las cepas evaluadas; lo que difiere a lo observado en este estudio, donde todas las cepas presentaron crecimiento bacteriano al cabo de 10 días de cultivo. Sathishkumar *et al.*, (2008) reportó que el 51,61% de cepas evaluadas presentó un bajo crecimiento, mientras que en este trabajo se obtuvo un porcentaje superior (79,54%) de cepas con bajo crecimiento; esta diferencia se debe a que Sathishkumar *et al.*, (2008) trabajó a una concentración de petróleo menor a la utilizada en este trabajo, lo cual reduce el efecto tóxico de los componentes del crudo.

Perfil degradativo sobre hidrocarburos

Con respecto al ensayo de crecimiento sobre distintos sustratos, es notorio el efecto que tienen las diferentes fuentes de carbono sobre la turbidez obtenida luego de 10 días de crecimiento; así podemos observar que la parafina y la gasolina de 84 octanos permiten el crecimiento de todas las cepas, seguido del kerosene (crecimiento del 86,3% de las cepas); por último la borra (crecimiento del 15,9% de las cepas) esto se explica a la diferencia en la composición de cada sustrato y al tipo de exposición previa al hidrocarburo (Merino *et al.*, 2015).

La parafina líquida es una mezcla purificada de hidrocarburos saturados en el rango de C₁₄ - C₁₈ e hidrocarburos cíclicos (Acofarma); mientras que la gasolina está conformada por una combinación compleja de hidrocarburos, siendo en su

mayoría saturados e insaturados en el rango de $C_5 - C_{12}$ (PetroPerú S.A, 2013) con aditivos como metil *tert*-butil éter (MTBE), metilciclopentadienil tricarbonil manganeso (MMT), y en menor medida, presencia de aromáticos, benceno, etc. (Amanaqui y Aguilar, 2011). La composición de estos productos químicos asegura una fuente de carbono fácilmente degradable (hidrocarburos saturados de $C_{10} - C_{12}$ para la gasolina y de $C_{14} - C_{18}$ para la parafina) lo que permite el crecimiento de todas las cepas; sin embargo la presencia de hidrocarburos en el rango de $C_5 - C_{10}$ en la gasolina inhibe la degradación por la destrucción de la membrana lipídica del microorganismo (Cando, 2011) así como la dificultad en la degradación de los aditivos (Steffan *et al.*, 1997) explicaría el mayor crecimiento observado en los cultivos con parafina.

El kerosene es una combinación compleja de hidrocarburos con número de carbonos en su mayor parte dentro del rango de $C_6 - C_{16}$ (Repsol, 2006) siendo en su mayoría cicloparafinas seguido por saturados y aromáticos, además contiene una gran cantidad de aditivos como antioxidantes, desactivador de metales, inhibidores de corrosión, mejoradores de lubricidad, biocidas, etc y azufre en concentraciones de 50 ppm (Parkash, 2010). La presencia de esta gran cantidad de aditivos e hidrocarburos en el rango de $C_5 - C_{10}$ explicaría la reducción en el porcentaje de crecimiento observado en las cepas.

La borra es un residuo denso y viscoso proveniente de los fondos de tanques debido a la decantación de sólidos del crudo (Valdez, 2011), conteniendo compuestos altamente recalcitrantes como hidrocarburos de cadena larga, cicloalcanos, benceno, tolueno, xilenos, fenoles, PHAs de alto peso molecular y una alta concentración de metales pesados (de Almeida Andrade *et al.*, 2014); esta composición le permite ser altamente resistente a la degradación bacteriana (Guimarães *et al.*, 2016; Pinedo *et al.*, 2014) explicando el bajo porcentaje de

cepas que lograron un crecimiento en el medio con borra como fuente de carbono.

Actividad emulsificante

La transferencia del hidrocarburo de la fase insoluble es considerada como una limitante para su degradación, debido a que los compuestos deben estar en la fase acuosa para ser interiorizados por las células microbianas y la subsecuente transformación intracelular por su metabolismo (Dean *et al.*, 2001), eso se refleja en el trabajo de Kumar *et al.*, (2006), quien reporto, que un co-cultivo entre cepas degradadoras de crudo y productoras de biosurfactantes incrementa la capacidad de degradación de hidrocarburos en sistemas líquidos y sólidos mediante la activación de rutas catabólicas sinérgicas e incremento de la disponibilidad de los sustratos.

En este trabajo se determinó la actividad emulsificante de las 44 cepas, obteniendo valores menores a los reportados por Escalante, (2002) y Samanez, (2008), quienes obtuvieron valores en el rango de los 3 UAE/ml; sin embargo, se obtuvieron valores superiores a los obtenidos por Trejo, (1996) a partir de cepas aisladas de ambientes no contaminados y similares a los resultados obtenidos por (Merino *et al.*, 2015) en la base “Machu Picchu” de la Antártida. Cabe mencionar que en este trabajo se obtuvo un amplio rango de valores de actividad emulsificante (0,001 a 2,284 UAE/ml) lo que indica una gran diversidad genética entre las cepas.

6.2 Selección de las cepas y evaluación de la actividad antagonista

Pre-selección de las cepas

Debido a la gran cantidad de variables utilizadas para la caracterización de la capacidad degradativa de las cepas, fue necesario realizar un PCA para procesar la información y determinar patrones de comportamiento de las cepas; esto permitió definir 5 grupos de cepas con patrones diferentes; además de 10 cepas con comportamiento único, las cuales presentaron los valores más altos de crecimiento sobre diferentes sustratos y actividad degradativa.

Para realizar la pre-selección de las cepas en base a la actividad emulsificante, se realizó la prueba de ANOVA y Tukey de las 10 cepas con mayor UAE/ml, comprobando la existencia de diferencias significativas entre dichas cepas; esto permitió escoger las 3 cepas con la mayor actividad emulsificante.

Evaluación de la actividad antagonista

Con la finalidad de potenciar la actividad degradativa de los microorganismos se planteó la posibilidad de establecer un consorcio microbiano, para lo cual fue necesario realizar pruebas de antagonismo para descartar cepas que generaran algún tipo de inhibición sobre las demás.

Durante las pruebas de antagonismo en agar, la cepa C12PCD22a fue inhibida por 4 cepas distintas (C12CETRID4a, C12CETRID4b, C1BHIC5 y C3ACETC53a); mientras que la cepa C3ACETC53a presentó en mayor rango de inhibición afectando a 3 cepas (C12CETRID4b, C12PCD22a y C12CETRID4a), sin embargo fue la cepa C12PCD22a que tuvo la mayor actividad antagónica generando el mayor porcentaje de inhibición (57,9%) frente a la cepa C10PCC11. Cabe mencionar que existieron cepas que no inhibieron a ninguna

otra cepa (C3ACETC53 y C10PCC11) así como cepas que no se vieron afectadas (C3ACETC53b, C1BHIC5 Y C3ACETC53a); las cuales tuvieron el potencial para integrar el consorcio.

Si bien no hay estudios específicos que determinen el antagonismo entre cepas bacterianas relacionadas con la zona de estudio. La evaluación del antagonismo ha sido utilizada para la conformación de consorcios degradadores de otros compuestos orgánicos (Gaitan y Perez, 2007).

6.3 Formulación del consorcio a utilizar e identificación de las cepas

Formulación del consorcio

Se pre-seleccionaron 7 cepas, en base a su actividad degradativa y emulsificante, las cuales fueron evaluados para determinar si existe antagonismo entre ellas; según los resultados existieron 3 cepas (C3ACETC53b, C1BHIC5, C3ACETC53a) que no fueron afectadas por ninguna otra, lo que permitió su cultivo en conjunto.

Identificación molecular de las cepas

En base al secuenciamiento del gen del RNA ribosomal 16S se logró identificar las 3 cepas bacterianas, estando 2 de ellas relacionadas a *Pseudomonas aeruginosa* y una a *Bacillus subtilis* de acuerdo al método *Maximum Likelihood Bootstrap* de 1000 repeticiones. Estos géneros han sido aislados en diferentes trabajos a partir de suelos contaminados con hidrocarburos (Sathishkumar *et al.*, 2008; Samanez, 2008; Narváez-Flórez *et al.*, 2008; Kaplan y Kitts, 2004; Echeverri *et al.*, 2010; Jalilzadeh *et al.*, 2014; Das y Mukherjee, 2007; Wongsu *et al.*, 2004; Montenegro, 2007; Singh *et al.*, 2015), así como productores de biosurfactantes (Das y Chandran, 2011; Giraldo, 2012).

6.4 Evaluación del consorcio bacteriano sobre la degradación de hidrocarburos en medio líquido.

Cinética de crecimiento

Según lo esperado, los datos obtenidos evidencian un efecto considerable de la fuente de carbono sobre el comportamiento del consorcio bacteriano; específicamente sobre la producción de biomasa bacteriana; lo cual ha sido corroborado por Abalos *et al.*, (2002) quien indica que, junto con la fuente de nitrógeno, el tipo de carbono utilizado es esencial para la síntesis de proteínas y macromoléculas.

En este caso particular se están comparando 2 tipos de fuente de carbono de naturaleza distinta, la glucosa hidrofílica con una única fórmula molecular simple y el petróleo hidrófobo compuesto por una mezcla compleja de hidrocarburos con distintas características. Esta diferencia explica la aparición de una fase Lag y un menor crecimiento bacteriano cuando se utiliza petróleo, ya que es necesaria la producción de biosurfactantes para incrementar la hidrofobicidad de las células y/o emulsificación del petróleo y/o solubilización del sustrato (Stoimenova *et al.*, 2009) a fin de estimular su degradación. Estos resultados son contrarios a los obtenidos por Martinez, (2015) que reportó que fuentes hidrofóbicas generan mayor biomasa.

Cabe indicar que en el caso del petróleo luego de los 7 días aún no se observó una fase de muerte, lo que implica que la degradación de petróleo se mantiene constante producto de las sucesiones bacterianas al interior del cultivo mixto, posiblemente cada cepa tiene un papel en la transformación de hidrocarburos, generando productos intermedios que son subsecuentemente empleados por

otra cepa manteniendo elevada la oferta de sustratos (Narváez-Flórez *et al.*, 2008).

Degradación de hidrocarburos en medio líquido

De acuerdo a los resultados se ha obtenido una reducción en la concentración de los TPH (C₁₀-C₄₀) del 95,13% luego de 42 días de incubación con el consorcio definido; de los cuales el 25,25% es atribuible a la degradación microbiana durante el ensayo.

Este porcentaje de degradación obtenido es menor a los obtenidos por Burns *et al.*, 1999 donde obtuvieron valores de degradación microbiana entre 36% y 57% después de 52 semanas bajo condiciones aeróbicas y al 33% de degradación obtenido por Ali y Ahmed, (2012), luego de 24 días en condiciones similares por un consorcio compuesto por 15 cepas bacterianas con concentraciones iniciales por debajo de 8000 mg/L. Sin embargo, los resultados del ensayo del consorcio definido son superiores a los obtenidos por Omotayo *et al.*, (2012) quien realizó ensayos de degradación con 4 cepas puras obteniendo porcentajes de degradación entre 88% y 93% luego de 30 días de incubación con concentraciones iniciales por debajo de 4000 mg/L y similar a lo reportado por Lee *et al.*, (2006) que obtuvo 30.5% de degradación microbiana de diesel con concentraciones iniciales de 20 000 mg/L luego de 7 días de cultivo. Cabe mencionar que no se tienen datos de degradación intermedios pero se espera que la tasa de degradación haya variado de acuerdo a la fase de remediación, con una mayor velocidad en la etapa inicial y disminuyendo hasta alcanzar una asíntota (Ali y Ahmed, 2012).

Los resultados de otras investigaciones indican que la biodegradación y degradación físico-química tienen efectos opuestos en los hidrocarburos;

mientras que la degradación microbiana resulta en la reducción de alcanos no volátiles, la fotooxidación degrada selectivamente compuestos aromáticos (Garrett *et al.*, 1998). Con respecto a la evaporación, esta solo afecta a las fracciones más ligeras, < n-C12, (Rogerson y Berger, 1983; Burns *et al.*, 1999) lo que se comprueba con los resultados de la reducción del porcentaje de degradación en el control abiótico.

VII. CONCLUSIONES

- De la evaluación de las 44 cepas, se identificaron 10 cepas con un perfil degradativo diferenciado, así como 3 cepas con actividad emulsificante superior al resto de las cepas evaluadas.
- En base a los resultados de la prueba de antagonismo se seleccionó 3 cepas bacterianas, C1BHIC5 y C3ACETC53a, relacionadas a *Pseudomonas aeruginosa*, y C3ACETC53b, relacionada a *Bacillus subtilis*, y se conformó un consorcio con capacidad degradadora y emulsificante de hidrocarburo.
- A los 42 días, el sistema de degradación de hidrocarburos en medio líquido que incluyó el consorcio bacteriano seleccionado mostró un porcentaje de degradación del 95,13%, de los cuales el 25,25% es atribuible a la degradación microbiana.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ ABALOS, A., MAXIMO, F., MANRESA, M.A. y BASTIDA, J. Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2002, vol. 77, pp. 777-784.
- ❖ ACOFARMA, Ficha de información técnica Vaselina líquida.
- ❖ AGNELLO, A. Petroleum-derived spray oils: chemistry, history, refining and formulation. *Spray Oils - Beyond*, 2002, pp. 2-18
- ❖ ALI, Z. y AHMED, S. Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium. *African Journal of Biotechnology*, 2012, vol. 11, no. 3, pp. 650-658.
- ❖ ALKORTA, I. y GARBISU, C. Phytoremediation of organic contaminants in soils. *Bioresource technology*, 2001, vol. 79, no. 3, pp. 273-276.
- ❖ ALS LS PERÚ. Informe de ensayo: 60927/2019. 2019
- ❖ AMANAQUI, M.E. y AGUILAR, J.L. "Estudio técnico - económico de prefactibilidad de un proceso de transformacion para el incremento de octanaje de gasolinas en refinarias de la selva del Perú". Tesis Título Profesional UNI, Facultad de Ingeniería Química y Textil, Lima, 2011.
- ❖ ARENAS, S.M. "Aislamiento y caracterización de bacterias de ambientes contaminados por petroleo en la refineria La Pampilla Lima". Tesis Título Profesional UNMSM, EAP Ciencias Biológicas, Lima, 1999.
- ❖ ATLAS, R.M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbiological reviews*, 1981, vol. 45, no. 1, pp. 180-209.
- ❖ BARTHA Y ATLAS. Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4ta Ed. Pearson, 2002, 696 pp., ISBN 9788478290390.
- ❖ BARRIOS-SAN MARTÍN, Y., ACOSTA, S., SÁNCHEZ, A., TOLEDO, A., GONZÁLEZ, F. y GARCÍA, R.M. Estudio y selección de bacterias aerobias

degradadoras de hidrocarburos del petróleo aisladas de costas de Cuba. *Biotecnología Aplicada*, 2012, vol. 29, no. 2, pp. 73-79.

- ❖ BENTO, F.M., CAMARGO, F. a O., OKEKE, B.C. y FRANKENBERGER, W.T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource technology*, 2005, vol. 96, no. 9, pp. 1049-55.
- ❖ BERNAD, I.O., GARCIA, J.S., VALIÑO, M.D. y FERNANDEZ, S.V. Técnicas de recuperación de suelos contaminados. *Informes de vigilancia tecnológica*, 2007, 6.
- ❖ BRITO, O.O., LEMA, I.I. y GARCÍA, A.G. La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta Ecológica*, 2003, no. 69, pp. 83-92.
- ❖ BUJANG, M., IBRAHIM, N.A. y EH RAK, A. a/l. Biodegradation of oily wastewater by pure culture of *Bacillus cereus*. *ARPJ Journal of Agricultural and Biological Science*, 2013, vol. 8, no. 2, pp. 108-115.
- ❖ BURNS, K.A., CODI, S., SWANNELL, R.J.P. y DUKE, N.C. Assessing the oil degradation potential of endogenous micro-organisms in tropical marine wetlands. *Mangroves and Salt Marshes*, 1999, vol. 3, pp. 67-83.
- ❖ CANDO, M.A. "Determinación y análisis de un proceso de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos". Tesis Título Universidad Politécnica Salesiana, Carrera de Ingeniería Ambiental, Cuenca, 2011.
- ❖ DAS, K. y MUKHERJEE, A.K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, 2007, vol. 98, no. 7, pp. 1339-1345.
- ❖ DAS, N. y CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnology Research International*, 2011, pp. 1-13. ISSN 2090-3138.

- ❖ DE ALMEIDA, M.R., FIQUENE DE BRITO, A.L. y SILVA, A.C. Tratamento da borra oleosa de petróleo e estudo cinético do processo de estabilização por solidificação. *Revista Brasileira de Ciências Ambientais*, 2014, vol. 31, pp. 66-75.
- ❖ DEAN, S.M., JIN, Y., CHA, D.K., WILSON, S. V. y RADOSEVICH, M. Phenanthrene degradation in soils co-inoculated with phenanthrene-degrading and biosurfactant-producing bacteria. *Journal of Environmental Quality*, 2001, vol. 30, pp. 1126-1133.
- ❖ DELGADO, S.M. "Una aplicación del análisis de componentes principales categoricas para determinar el posicionamiento de espol en el contexto de los estudiantes de 3er año de bachillerato". Tesis Título Escuela Superior Politécnica del Litoral, Instituto de Ciencias Matematicas, Guayaquil, 2006.
- ❖ EARL, A.M., LOSICK, R. y KOLTER, R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol*, 2008, vol. 16, no. 6, pp. 1-11.
- ❖ ECHEVERRI, G.E., MANJARREZ, G. y CABRERA, M. Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia. *Nova*, 2010, vol. 8, no. 13, pp. 76-86.
- ❖ ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). *Treatment technologies for site cleanup: Annual status report*. Tenth Edition, 2001.
- ❖ ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). *Treatment technologies for site cleanup: Annual Status Report*. Twelfth edition. 2007.
- ❖ ESCALANTE, R.M. "Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios". Tesis Maestria UNMSM, Facultad de Farmacia y Bioquímica Unidad de Post Grado, Lima, 2002.
- ❖ EWEIS, J.B., ERGAS, S.J., CHANG, D.P. y SCHROEDER, E.D. *Bioremediation principles*. McGraw-Hill International Editions, 1998.
- ❖ GAITAN, D.M. y PEREZ, L.I. "Aislamiento y evaluación de microorganismos

celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de Crisanteno (*Dendranthema grandiflora*). Tesis Título Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá, 2007.

- ❖ GARRETT, R.M., PICKERING, I.J., HAITH, C.E. y PRINCE, R.C. Photooxidation of crude oils. *Environmental Science & Technology*, 1998, vol. 32, no. 23, pp. 3719-3723.
- ❖ GELLATLY, S.L. y HANCOCK, R.E.W. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, 2013, vol. 67, no. 3, pp. 159-173.
- ❖ GIRALDO, J.D., 2012. "Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* Pb 25: Evaluación de su actividad emulsificante y de remoción de metales pesados". Tesis Título Profesional UNMSM, EAP Ciencias Biológicas, Lima, 2012.
- ❖ GUIMARÃES, A.K.V., CHIAVONE-FILHO, O., DO NASCIMENTO, C.A.O., TEIXEIRA, A.C.S.C. y MELO, H.N. de S. Estudo da caracterização da borra de petróleo e processo de extração do óleo. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, 2016, vol. 21, no. 2, pp. 265-274.
- ❖ HARAYAMA, S., KISHIRA, H., KASAI, Y. y SHUTSUBO, K. Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1999, vol. 1, no. 1, pp. 63-70.
- ❖ HASSANSHAHIAN, M., EMTIAZI, G. y CAPPELLO, S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 2012, vol. 64, no. 1, pp. 7-12.
- ❖ HASSANSHAHIAN, M., ZEYNALIPOUR, M.S. y MUSA, F.H. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance). *Marine Pollution Bulletin*, 2014, vol. 82, no. 1-2, pp. 39-44.
- ❖ IBARRA, D.M. "Evaluación del potencial de biodegradación de hidrocarburos

totales de petróleo (TPH) en suelos contaminados procedentes de PETROSANTANDER (Colombia) INC". Tesis Título Universidad Pontificia Bolivariana, Facultad Ingeniería Ambiental, Bucaramanga, 2008.

- ❖ ISMAIL, S. y DADRASNIA, A. Biotechnological potential of *Bacillus salmalaya* 139SI: A novel strain for remediating water polluted with crude oil waste. *PLoS ONE*, 2015, vol. 10, no. 4, pp. 1-13.
- ❖ JABEEN, S., KHAN, M.A.S., HASSAN, Q.M., AHMED, M.S., NISHAT, N. y ZAIN, H. Comparative study of bioremediation of crude oil by *Bacillus subtilis* and organic substances. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences. Sec. B*, 2015, vol. 5, no. 3, pp. 2621-2633.
- ❖ JALILZADEH, R., SEKHAVATJOU, M.S., MAKTABI, P., ARBAB, N., KHADIVI, S. y POURJAFARIAN, V. The biodegradation of crude oil by *Bacillus subtilis* isolated from contaminated soil in hot weather areas. *International Journal of Environmental Research*, 2014, vol. 8, no. 2, pp. 509-514.
- ❖ KAPLAN, C.W. y KITTS, C.L. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, vol. 70, no. 3, pp. 1777-1786.
- ❖ KUMAR, M., LEON, V., DE SISTO, A. y ILZINS, O.A. Enhancement of oil degradation by co-culture of hydrocarbon degrading and biosurfactant producing bacteria. *Polish Journal of Microbiology*, 2006, vol. 55, no. 2, pp. 139-146.
- ❖ LEE, M., KIM, M.K., SINGLETON, I., GOODFELLOW, M. y LEE, S.T. Enhanced biodegradation of diesel oil by a newly identified *Rhodococcus baikonurensis* EN3 in the presence of mycolic acid. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, vol. 100, no. 2, pp. 325-333.
- ❖ LEÓN, J. y GARCÍA-TELLO, P. Cepas nativas del bacterioneuston marino y su actividad inhibitoria de bacterias ictiopatógenas. *Revista Peruana De Biología*, 1988, vol. 5, no. 1, pp. 47-64.

- ❖ LÓPEZ DE MESA, B.J., QUINTERO, G., GUEVARA, A.L., JAIMES, D.C., GUTIÉRREZ, S.M. y MIRANDA, J. Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA*, 2006, vol. 4, no. 5, pp. 82-90.
- ❖ LOZARES, C. y LÓPEZ, P. El análisis de componentes principales: Aplicación al análisis de datos secundarios. *Papers: Revista de Sociologia*, 1991, vol. 37, pp. 31-63.
- ❖ MARKS, P.J., WUJCK, W.J. y LONCAR, A.F. Remediation technologies screening matrix and reference guide. 1994, Environmental Technology Transfer Committee
- ❖ MARTINEZ, D. "Optimización de la fuente de carbono para la producción de un surfactante ramnolipídico por una cepa nativa de *Pseudomonas aeruginosa* 6K11". Tesis Título Profesional UNMSM, EAP Microbiología y Parasitología, Lima, 2015.
- ❖ MARTÍNEZ M., V.E. y LÓPEZ S., F. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra*, 2001, vol. 19, pp. 9-17.
- ❖ MATVYEYEVA, O.L., VASYLCHENKO, O.A. y ALIIEVA, O.R. Microbial biosurfactants role in oil products biodegradation. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 2014, vol. 2, no. 2, pp. 69-74.
- ❖ MERINO, F. "Estudio de microorganismos nativos productores de emulsificantes de petróleo". Tesis Maestria UNMSM, Facultad de Farmacia y Bioquímica Unidad de Post Grado, Lima, 1998.
- ❖ MERINO, F., MARTINEZ, D. y GUTIÉRREZ, S. Perfil degradativo sobre hidrocarburos de petróleo e identificación molecular de cepas bacterianas aisladas de la base peruana "Machu Picchu" en la Antártida. *Theorema*, 2015, vol. 2, no. 3, pp. 57-68.

- ❖ MILLS, A.L., BREUIL, C. y COLWELL, R.R. Enumeration of petroleum-degrading marine and estuarine microorganisms by the most probable number method. *Canadian Journal of Microbiology*, 1978, vol. 24, no. 5, pp. 552-557.
- ❖ MISHRA, S., JYOT, J., KUHAD, R.C. y LAL, B. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. *Applied And Environmental Microbiology*, 2001, vol. 67, no. 4, pp. 1675-1681.
- ❖ MONTENEGRO, F.A. "Aislamiento y selección de cepas bacterianas nativas de suelos de la XII región de Chile, para la degradación de crudos de petróleo". Tesis Licenciado Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Valdivia, 2007.
- ❖ NARVÁEZ-FLÓREZ, S., GÓMEZ, M.L. y MARTÍNEZ, M.M. Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas de sedimentos del Caribe Colombiano. *Boletín de investigaciones marinas y costeras*, 2008, vol. 37, no. 1, pp. 61-75.
- ❖ OMOTAYO, A.E., OJO, O.Y. y AMUND, O.O. Crude oil degradation by microorganisms in soil composts. *Research Journal of Microbiology*, 2012, vol. 7, no. 4, pp. 209-218.
- ❖ ORTIZ, J.I., SALVADOR, J.L., VÁZQUEZ, A. y DELGADO, J. Eliminación del mayor impacto ambiental de los campos petroleros. 2009, Organismo Supervisor de la Inversión en Energía y Minería (Osinergmin)
- ❖ OUYANG, W., LIU, H., MURYGINA, V., YU, Y., XIU, Z. y KALYUZHNYI, S. Comparison of bio-augmentation and composting for remediation of oily sludge: A field-scale study in China. *Process Biochemistry*, 2005, vol. 40, no. 12, pp. 3763-3768.
- ❖ PARDO, J.L., PERDOMO, M.C. y BENAVIDES, J.L. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *Nova*, 2004, vol. 2, no. 2, pp. 40-49.
- ❖ PARKASH, S. *Petroleum fuels manufacturing handbook, including specialty*

products and sustainable manufacturing techniques. New York: The McGraw-Hills Companies Inc. 2010.

- ❖ PETROPERÚ S.A. Hoja de seguridad Gasolina 84 octanos. 2013.
- ❖ PINEDO, J., IBÁÑEZ, R., LIJZEN, J.P.A. y IRABIEN, Á. Human risk assessment of contaminated soils by oil products: Total TPH content versus fraction approach. *Human and Ecological Risk Assessment*, 2014, vol. 20, no. 5, pp. 1231-1248.
- ❖ RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, vol. 62, no. 2, pp. 142-160.
- ❖ REPSOL. Hoja de seguridad Kerosene. 2006.
- ❖ RESTREPO, L.F., POSADA, S.L. y NOGUERA, R.R. Aplicación del análisis por componentes principales en la evaluación de tres variedades de pasto. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 2012, vol. 25, no. 2, pp. 258-266.
- ❖ RICOY, C., BOULÉ, N., AMAÍZ, L., TORCUATTI, E., MEDINA, L., VALBUENA, O. y FERNÁNDEZ, Z. Transferencia de la capacidad degradadora de combustible diesel a *Escherichia coli* DH5α por plásmidos de bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo. *Interciencia*, 2012, vol. 37, no. 9, pp. 671-677.
- ❖ ROGERSON, A. y BERGER, J. Enhancement of the microbial degradation of crude oil by the ciliate *Colpidium colpoda*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 1983, vol. 29, no. 1, pp. 41-50.
- ❖ RON, E.Z. y ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, vol. 13, no. 3, pp. 249-252.
- ❖ SAMANEZ, E. "Biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con petróleo crudo". Tesis Maestría UNMSM, Facultad de Farmacia y Bioquímica Unidad de Post Grado, Lima, 2008.
- ❖ SATHISHKUMAR, M., BINUPRIYA, A.R., BAIK, S.H. y YUN, S.E. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial

consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas. *Clean - Soil, Air, Water*, 2008, vol. 36, no. 1, pp. 92-96.

- ❖ SEMPLE, K.T., REID, B.J. y FERMOR, T.R. Impact of composting strategies on the treatment of soil contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution*, 2001, vol. 112, pp. 269-283.
- ❖ SERRANO, R. *Introducción al análisis de datos experimentales: Tratamiento de datos de bioensayos*. Segunda ed. Ciencias experimentales, 4, 2003.
- ❖ SILBY, M.W., WINSTANLEY, C., GODFREY, S.A.C., LEVY, S.B. y JACKSON, R.W. Pseudomonas genomes: Diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 2011, vol. 35, no. 4, pp. 652-680.
- ❖ SINGH, P., PARMAR, D. y PANDYA, A. Comparative study of Crude oil Degradation Efficiency of microbes Isolated from crude oil Contaminated site. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 2015, vol. 4, no. 2, pp. 91-94.
- ❖ SLEPECHY, R.A. y HEMPHILL, H.E. The genus Bacillus - nonmedical. En: *The Prokaryotes. Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. Second edi. S.I.: Springer, 2006, pp. 530-562.
- ❖ SOCIEDAD PERUANA DE DERECHO AMBIENTAL (SPDA), 2010. Lista de derrames de petroleo producidos en el Perú. En: SPDA Actualidad Ambiental. Disponible en: <https://www.actualidadambiental.pe/lista-de-derrames-de-petroleo-producidos-en-el-peru/>
- ❖ SPEIGHT, J.G., 1994. Chemical and physical studies of petroleum asphaltenes. En: G. V. CHILINGRARIAN y T.F. YEN (eds.), *Asphaltenes and Asphalts I: Development in Petroleum Science*. First edit. S.I.: Elsevier, pp. 459. ISBN 0387307478
- ❖ SPEIGHT, J.G., 1998. *Petroleum Chemistry and Refining*. Washington DC: Taylor & Francis. ISBN 1-56032-587-9.
- ❖ SPEIGHT, J.G., 2005. *The Desulfurization of Heavy Oils and Residua*. Secod.

New York: Marcel Dekker Inc. ISBN 0-8247-8921-0.

- ❖ SPEIGHT, J.G., 2014. *The Chemistry and Technology of Petroleum*. Fifth edit. New York: CRC press. ISBN 978-1-4398-7389-2.
- ❖ SPIERS, A.J., BUCKLING, A. y RAINEY, P.B. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology*, 2000, pp. 2345-2350.
- ❖ STEFFAN, R.J., MCCLAY, K., VAINBERG, S., CONDEE, C.W. y ZHANG, D. Biodegradation of the gasoline oxygenates methyl tert-butyl ether, ethyl tert-butyl ether, and tert-amyl methyl ether by propane-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, vol. 63, no. 11, pp. 4216-4222.
- ❖ STOIMENOVA, E., VASILEVA-TONKOVA, E., SOTIROVA, A., GALABOVA, D. y LALCHEV, Z. Evaluation of different carbon sources for growth and biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* isolated from wastewaters. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 2009, vol. 64, no. 1-2, pp. 96-102.
- ❖ TREJO, C.A. "Aislamiento de bacterias degradantes y emulsificadoras de petróleo de ambientes no contaminados por hidrocarburos". Tesis Título Profesional UNMSM, EAP Ciencias Biológicas, Lima, 1996.
- ❖ VALDEZ, C.W., 2011. "Tratamiento físico químico de residuos oleosos". Tesis Título Profesional UNI, Facultad de Ingeniería de Petróleo, Gas Natural y Petroquímica, Lima, 2011.
- ❖ VÁZQUEZ-LUNA, D., CASTELÁN-ESTRADA, M., RIVERA-CRUZ, M. del C., ORTIZ-CEBALLOS, Á.I. y IZQUIERDO R., F. *Crotalaria incana* L. y *Leucaena leucocephala* Lam. (Leguminosae): Especies indicadoras de toxicidad por hidrocarburos de petróleo en el suelo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 2010, vol. 26, no. 3, pp. 183-191.
- ❖ VELASCO, J.A. y VOLKE, T.L. El composteo: Una alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México. *Gaceta Ecológica*, 2003, vol. 66, pp. 41-53.

- ❖ VILLARROEL, L., ALVAREZ, J. y MALDONADO, D. Aplicación del análisis de componentes principales en desarrollo de productos. *Acta NOVA*, 2013, vol. 2, no. 3, pp. 399-408.
- ❖ WESTERDAHL, A., OLSSON, J.C., KJELLEBERG, S. y CONWAY, P.L. Isolation and characterization of Turbot (*Scophthalmus maximus*) - associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, vol. 57, no. 8, pp. 2223-2228.
- ❖ WONGSA, P., TANAKA, M., UENO, A., HASANUZZAMAN, M., YUMOTO, I. y OKUYAMA, H. Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. *Current Microbiology*, 2004, vol. 49, no. 6, pp. 415-422.
- ❖ YENGLE, C. Aplicación del análisis de componentes principales como técnica para obtener índices sintéticos de calidad ambiental. *UCV - Scientia*, 2012, vol. 4, no. 2, pp. 145-153.
- ❖ ZAMORA, A., RAMOS, J. y ARIAS, M. Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro*, 2012, vol. 24, no. 1, pp. 5-12.

IX. ANEXO

9.1 Resultados

Tabla 13. Crecimiento de las cepas evaluadas según la escala de turbidez de McFarland sobre diferentes hidrocarburos a los 10 días de incubación.

Cepa	Escala McFarland				
	Crudo	Borra	Parafina	Kerosene	Gasolina 84 oct.
C1BHIC5	3	2	3	2	3
C3PCA4ç	0,5	0	0,5	0	0,5
C2PCB51a	0,5	0	1	0,5	0,5
C2PCB51b	0,5	0	0,5	0,5	0,5
C2PCB51c	0,5	0	1	0	0,5
C3ACETC53a	3	0,5	3	0,5	3
C3ACETC53b	3	0,5	3	2	3
C6CETRIA12a	0,5	0	0,5	0,5	0,5
C6CETRIA12b	0,5	0	0,5	0,5	0,5
C6CETRIA12c	0,5	0	0,5	0,5	0,5
C7BCB12	0,5	2	1	0,5	0,5
C8PCA14a	0,5	0	0,5	0,5	0,5
C8PCA14b	0,5	0	0,5	0,5	0,5
C8PCA14c	1	0	0,5	0,5	0,5
C6PCB32	0,5	0	0,5	0,5	0,5
C8PCD1a	0,5	0	0,5	0	0,5
C8PCD1b	0,5	0	0,5	1	0,5
C10PCA43a	0,5	0	1	1	0,5
C10PCA43b	0,5	0	1	0,5	0,5
C10PCA43c	0,5	0	1	0,5	0,5
C10PCB42a	0,5	0	0,5	0,5	0,5
C10PCB5	0,5	0	1	0,5	0,5
C10PCC11	0,5	0	0,5	0,5	0,5
C10PCC12a	0,5	0	0,5	0	0,5
C10PCC12b	1	0	0,5	0	0,5
C10BHID1	1	0	0,5	0,5	0,5
C11PC41	0,5	0	0,5	0,5	1
C10BHI1	0,5	0	0,5	0,5	0,5
C10PCB42b	0,5	0	0,5	0	0,5
C11BHI2a	0,5	0	0,5	0,5	0,5
C11BHI2b	0,5	0	0,5	0,5	0,5
C11BHI32	0,5	0	1	0,5	0,5

Cepa	Escala McFarland				
	Crudo	Borra	Parafina	Kerosene	Gasolina 84 oct.
C11BHI41	0,5	0	1	1	0,5
C11BHII5a	0,5	0	1	0,5	0,5
C11BHII5b	0,5	0	0,5	0,5	0,5
C12A42a	0,5	0	0,5	0,5	0,5
C12A42b	0,5	0	1	1	0,5
C12PCB23	0,5	0	0,5	1	0,5
C12PCD21	0,5	0	0,5	0,5	0,5
C12PCD22a	2	0,5	3	0,5	3
C12PCD22b	1	0	1	1	0,5
C12PCD22c	0,5	0	0,5	0	0,5
C12CETRID4a	1,66666667	1	3	1	3
C12CETRID4b	0,5	0,5	3	1	0,5

Tabla 14. Actividad emulsificante (UAE/mL) de las cepas evaluadas a los 7 días de incubación.

Cepa	Absorbancia	UAE/ML
C1BHIC5	2,799	2,284
C12PCD22a	2,128	1,736
C10PCC11	1,815	1,481
C12CETRID4a	0,923	0,753
C10PCC12a	0,244	0,199
C10PCA43b	0,193	0,157
C10PCB42a	0,118	0,096
C11BHII5a	0,065	0,053
C11BHI2b	0,053	0,043
C6CETRIA12a	0,045	0,037
C12A42a	0,048	0,039
C10PCB42b	0,044	0,036
C10PCA43c	0,043	0,035
C11BHI41	0,041	0,033
C11BHII5b	0,034	0,028
C11PC41	0,034	0,028
C7BCB12	0,032	0,026
C10PCB5	0,031	0,025
C6PCB32	0,029	0,024
C10BHID1	0,029	0,024
C2PCB51b	0,027	0,022
C10PCA43a	0,025	0,020
C2PCB51c	0,022	0,018
C8PCA14b	0,022	0,018
C12A42b	0,022	0,018
C8PCD1b	0,019	0,016
C12CETRID4b	0,019	0,016
C8PCA14a	0,016	0,013
C10PCB42a	0,015	0,012
C3ACETC53a	0,014	0,011
C2PCB51a	0,013	0,011
C12A42b	0,011	0,009
C12PCD22c	0,009	0,007
C3ACETC53b	0,009	0,007
C6CETRIA12b	0,008	0,007
C10BHI1	0,008	0,007
C8PCA14c	0,007	0,006
C6CETRIA12c	0,006	0,005
C11BHI32	0,006	0,005
C3PCA4	0,004	0,003

Cepa	Absorbancia	UAE/ML
C11BHI2a	0,004	0,003
C12PCB23	0,004	0,003
C8PCD1a	0,003	0,002
C12PCD21	0,001	0,001

Tabla 15. Parámetros de recuento de crecimiento con glucosa 3%.

Tiempo (h)	Recuento bacteriano (UFC/ml)	LN(Recuento bacteriano)	Δ LN(Recuento bacteriano)
0.00	1.40E+05	11.85	2.44
5.00	1.60E+06	14.29	
9.67	1.00E+07	16.12	1.83
12.50	1.10E+08	18.52	2.40
23.27	1.40E+09	21.06	2.54
27.50	1.70E+09	21.25	0.19
33.50	2.20E+09	21.51	0.26
36.50	2.60E+09	21.68	0.17
48.00	1.30E+09	20.99	-0.69

Tabla 16. Parámetros de recuento de crecimiento con petróleo 3%.

Tiempo (h)	Recuento bacteriano (UFC/ml)	LN(Recuento bacteriano)	Δ LN(Recuento bacteriano)
0.00	1.20E+06	14.00	-0.09
5.00	1.10E+06	13.91	
10.00	1.10E+07	16.21	2.30
13.00	1.70E+07	16.65	0.44
22.25	1.50E+08	18.83	2.18
29.00	3.80E+08	19.76	0.93
34.00	4.00E+08	19.81	0.05
48.00	3.40E+08	19.64	-0.16
71.67	4.90E+08	20.01	0.37
84.33	8.10E+08	20.51	0.50
			-1.10

Tiempo (h)	Recuento bacteriano (UFC/ml)	LN(Recuento bacteriano)	Δ LN(Recuento bacteriano)
96.33	2.70E+08	19.41	-0.59
107.00	1.50E+08	18.83	
119.50	3.10E+08	19.55	0.73
144.75	3.50E+08	19.67	0.12
156.00	2.80E+08	19.45	-0.22
168.17	2.00E+08	19.11	-0.34

Tabla 17. Porcentaje de degradación de cada hidrocarburo individual según el número de átomos de carbono en los ensayos y lo atribuible a la degradación microbiana.

Parámetro	Control abiótico	Consortio definido	Degradación microbiana
n-Undecano (C11)	97,06	99,99	2,93
n-Dodecano (C12)	94,52	99,99	5,46
n-Tridecano (C13)	85,20	99,02	13,82
n-Tetradecano (C14)	82,32	97,73	15,40
n-Pentadecano (C15)	69,24	97,93	28,68
n-Hexadecano (C16)	64,29	97,40	33,11
n-Heptadecano (C17)	66,11	96,17	30,06
n-Octadecano (C18)	66,43	96,52	30,08
n-Nonadecano (C19)	66,53	98,16	31,62
n-Eicosano (C20)	62,30	96,95	34,65
n-Heneicosano (C21)	67,14	96,64	29,49
n-Docosano (C22)	71,55	97,27	25,72
n-Tricosano (C23)	66,81	97,29	30,47
n-Tetracosano (C24)	71,52	98,12	26,59
n-Pentacosano (C25)	68,87	94,63	25,75
n-Hexacosano (C26)	69,92	97,28	27,35
n-Heptacosano (C27)	68,86	93,67	24,81
n-Octacosano (C28)	70,64	93,78	23,14
n-Nonacosano (C29)	66,84	91,85	25,00
n-Triacontano (C30)	70,46	90,17	19,71
n-Hentriacontano (C31)	55,89	93,09	37,19
n-Dotriacontano (C32)	67,18	91,42	24,24
n-Tritriacontano (C33)	65,12	89,62	24,49
n-Tetratriacontano (C34)	72,16	87,87	15,70
n-Pentatriacontano (C35)	64,10	85,64	21,53
n-Hexatriacontano (C36)	0	0	0

Parámetro	Control abiótico	Consortio definido	Degradación microbiana
n-Heptatriacontano (C37)	0	0	0
n-Octatriacontano (C38)	0	0	0
n-Nonatriacontano (C39)	0	0	0
n-Tetracontano (C40)	0	0	0

9.2 Análisis estadístico

Tabla 18. Valor de Jolliffe *cut-off* para determinar los componentes principales a utilizar en el biplot

PC	Eigenvalue	% varianza
1	0,288168	67,186
2	0,0837372	19,523
3	0,0329592	7,6844
4	0,0182666	4,2588
5	0,00578266	1,3482
Jolliffe cut-off = 0,06005		

Tabla 19. Prueba de normalidad de los datos de Actividad Emulsificante de las 10 cepas con mayor valor

Cepa	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.
C10PCA43b	,893	3	,363
C10PCB42a	1,000	3	1,000
C10PCC11	,818	3	,157
C10PCC12a	,942	3	,537
C11BHI2b	,923	3	,463
C11BHI5a	1,000	3	1,000
C12PCD22a	,818	3	,157
C12CETRID4a	1,000	3	1,000
C1BHIC5	1,000	3	1,000
C6CETRIA12a	,987	3	,780

Tabla 20. Prueba de homogeneidad de los datos de Actividad Emulsificante de las 10 cepas con mayor valor

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
1,169	9	20	,365

Tabla 21. Prueba de ANOVA

	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	28,804	9	3,200	111125,441	,000
Dentro de grupos	,001	20	,000		
Total	28,804	29			

Tabla 22. Prueba de Tukey de los datos de Actividad Emulsificante de las 10 cepas con mayor valor

Código cepa	N	Subconjunto para alfa = 0.05								
		A	B	C	D	E	F	G	H	I
C6CETRIA12a	3	,04500								
C11BHI2b	3	,05300	,05300							
C11BHI5a	3		,06500							
C10PCB42a	3			,11800						
C10PCA43b	3				,19300					
C10PCC12a	3					,24400				
C12CETRID4a	3						,92300			
C10PCC11	3							1,81500		
C12PCD22a	3								2,12800	
C1BHIC5	3									2,79900
Sig.		,713	,223	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.										